

Aus dem Fachbereich 08 - **Biologie** und Chemie -
der Justus-Liebig-Universität Gießen
angefertigt im Exzellenzcluster Kardiopulmonales System

**Die Rolle des serotonergen Systems und der Effekt des
Serotonin-Antagonisten Tergurid im Zigarettenrauch-
induzierten Lungenemphysemmodell der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Alexandra Pichl

aus Biebertal

Gießen 2013

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn
Institut für Chemie, FB 08
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Clauss
Institut für Tierphysiologie, FB 08
Abteilung Molekulare Zellphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Giessen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann
Exzellenzcluster Kardiopulmonales System (ECCPS)
Medizinische Klinik II/V
Justus-Liebig-Universität Gießen
Aulweg 130, 35392 Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs Molecular Biology and Medicine of the Lung (MBML) am Exzellenzcluster Kardiopulmonales System des Lungenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen (UGMLC, University of Giessen and Marburg Lung Center) und dem Zentrum für Innere Medizin – Medizinische Klinik II/V in der Zeit von Oktober 2008 bis Juli 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann angefertigt.

*Wenn Du denkst es geht nicht mehr,
kommt irgendwo ein Lichtlein her.
Ein Lichtlein wie ein Stern so klar,
es wird Dir leuchten immer da.*

*Wird zeigen Dir den Weg zurück,
den Weg zu einem neuen Glück.
Dum glaub daran - verzage nie,
es geht schon weiter - irgendwie.*

*Und mit Willen, Kraft und Mut,
wird dann alles wieder gut.
Du mußt nur immer fest dran glauben
und laß Dir nur den Mut nie rauben.*

*Es gibt für alles einen Weg,
und sei's auch nur ein kleiner Steg.
Es gibt nunmal nicht nur gute Zeiten,
das Leben hat auch schlechte Seiten.*

*Doch wie bist Du stolz, wenn Du's geschafft,
aus Sorgen und Nöten - mit eigener Kraft,
herauszukommen, was Du nie geglaubt,
da man Dich sooft schon der Hoffnung beraubt.*

*Doch die Hoffnung auf ein besseres Leben,
die lasse Dir bitte, niemals nehmen.
Denn wenn Du denkst es geht nicht mehr,
kommt irgendwo ein Lichtlein her.*

© Roswitha Rudzinski

Danke Oma

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	11
2	EINLEITUNG.....	18
2.1	Die humane Lunge	18
2.1.1	Die Anatomie und Physiologie	18
2.1.2	Der Gasaustausch und der Blutkreislauf	19
2.1.3	Aufbau der Blutgefäße und Alveolen.....	21
2.1.4	Ventilation der Lunge und Spirometrie.....	22
2.2	Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	24
2.2.1	Definition	24
2.2.2	Epidemiologie	26
2.2.3	Risikofaktoren	27
2.2.3.1	Zigarettenrauch.....	27
2.2.3.2	Berufliche Belastungen, Umwelt- und Raumluftverschmutzungen.....	28
2.2.3.3	Genetische Faktoren.....	28
2.2.3.4	Andere Risikofaktoren	29
2.2.4	Pathophysiologie der COPD	29
2.2.4.1	Chronische Bronchitis	30
2.2.4.2	Obstruktion der kleinen Atemwege.....	30
2.2.4.3	Emphysem.....	31
2.2.4.4	Gefäßveränderungen	32
2.2.4.5	Systemische Effekte	32
2.2.5	Pathogenese der COPD	32
2.2.5.1	Inflammation	33
2.2.5.2	Proteasen-Antiproteasen-Dysbalance.....	35
2.2.5.3	Oxidativer Stress	36
2.2.5.4	Apoptose	38
2.2.6	Derzeitige Behandlungsstrategien von COPD	39
2.3	Serotonin (5-HT).....	41
2.3.1	Der Einfluss von Zigarettenrauch auf das serotonerge System in COPD und anderen Lungenerkrankungen.....	48
2.4	Der Serotonin-Rezeptor-Antagonist Tergurid	50

2.5	Ziel der Arbeit	52
3	MATERIAL UND METHODEN	53
3.1	Material	53
3.1.1	Primerdesign und verwendete Primer	62
3.1.2	Antikörper für Western Blot	63
3.2	Methoden	64
3.2.1	Versuchstiere und Forschungsobjekte.....	64
3.2.1.1	C57BL/6J-Maus	64
3.2.1.2	Rauchexposition	65
3.2.1.3	Behandlung der Tiere mit Tergurid.....	66
3.2.1.3.1	Versuchsgruppen	66
3.2.1.4	Humanes Lungengewebe	67
3.2.1.5	Tierversuchsgenehmigung	68
3.2.2	Physiologische Untersuchungen	68
3.2.2.1	Narkose	68
3.2.2.2	Lungenfunktionsmessung.....	68
3.2.2.2.1	Tracheotomie.....	69
3.2.2.2.2	Datenerfassung	69
3.2.2.3	Hämodynamische Messungen.....	70
3.2.2.3.1	Präparation der linken <i>A. carotis</i>	70
3.2.2.3.2	Präparation der rechten <i>V. jugularis</i>	71
3.2.2.3.3	Messung des arteriellen und rechtsventrikulären Druckes	71
3.2.2.3.4	Messung des arteriellen Sauerstoff-Partialdruckes.....	71
3.2.2.4	Hämatokrit-Messung	72
3.2.2.5	Blutentnahme	72
3.2.2.6	Entnahme und Fixierung der Lunge.....	72
3.2.2.7	Messung der Rechtsherzhypertrophie	73
3.2.3	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen.....	74
3.2.3.1	Alveolare Morphometrie	74
3.2.3.1.1	Hämatoxylin–Eosin (HE)-Färbung	74
3.2.3.1.2	Morphometrische Analyse der Alveolen.....	75
3.2.3.2	Vaskuläre Morphometrie.....	76
3.2.3.2.1	Doppelfärbung.....	76
3.2.3.2.2	Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades	78

3.2.3.2.3	Bestimmung der Ratio der Alveolen zu den Gefäßen	79
3.2.3.3	3-Nitrotyrosin-Färbung	80
3.2.4	Zellkultur	81
3.2.4.1	Isolierung und Kultivierung von Maus-Endothelzellen	81
3.2.4.2	Isolierung und Kultivierung von murinen Alveolarepithel-Zellen Typ II (AEC II) ...	82
3.2.4.3	Messung der Proliferation	82
3.2.4.4	Messung der Apoptoserate	83
3.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	83
3.2.5.1	Laser-Mikrodissektion	83
3.2.5.2	RNA-Expressions-Untersuchungen	84
3.2.5.2.1	Aufreinigung von RNA aus Lungengewebe und mikrodisektiertem Material	84
3.2.5.2.2	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion.....	85
3.2.5.2.3	Quantitative Real-Time PCR.....	85
3.2.5.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	87
3.2.5.3	Untersuchungen der Proteinexpression	87
3.2.5.3.1	Proteinaufreinigung aus Lungengewebe	87
3.2.5.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	88
3.2.5.3.3	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	88
3.2.5.3.4	Western Blot.....	89
3.2.6	Serotonin-ELISA von Plasmaproben	90
3.2.7	Statistische Analyse.....	91
4	ERGEBNISSE.....	92
4.1	Expressions-Analysen der Serotoninrezeptoren 5-HTR _{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) bei COPD-Patienten GOLD-IV	92
4.2	Expressions-Analysen der Serotoninrezeptoren 5-HTR _{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) während der Rauch-induzierten Emphysem-Entwicklung in Wildtyp (Wt)-Mäusen	94
4.3	Überlebensrate und Veränderung des Körpergewichts während der präventiven Behandlung der Mäuse mit Tergurid oder Placebo im Rauch-induzierten Emphysemmodell.....	97
4.4	Arterieller Sauerstoff-Partialdruck und Hämatokrit	100

4.5	Einfluss der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Entwicklung eines Lungenemphysems in Mäusen.....	101
4.6	Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie und den pulmonal-vaskulären Umbau (<i>Remodeling</i>) .	105
4.7	Einfluss der präventiven Behandlung mit Tergurid auf das Verhältnis der Alveolen zu Gefäßen nach 8-monatiger Rauch-Exposition	112
4.8	Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Serotonin-Konzentration im Plasma von 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen	113
4.9	Kompartiment-spezifische Expression der Serotoninrezeptoren 5-HTR _{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) nach präventiver Behandlung mit Tergurid und 8-monatiger Rauch-Exposition	114
4.10	Expression von 3-Nitrotyrosin im Lungenhomogenat von präventiv behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauch-Exposition.....	117
4.11	Wirkung von Serotonin und Tergurid auf Zelltyp-spezifische Apoptose und Proliferation	119
5	DISKUSSION	121
5.1	Die Wahl des Tiermodells	121
5.2	Expressions-Analysen der Serotoninrezeptoren 5-HTR _{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) bei COPD-Patienten (GOLD-IV) und in Rauch-exponierten Mäusen	123
5.3	Präventive Behandlung mit Tergurid im Rauch-induzierten Lungenemphysemmodell der Maus	125
5.3.1	Überlebensrate und Veränderung des Körpergewichts der Mäuse	126
5.3.2	Arterieller Sauerstoff-Partialdruck und Hämatokrit.....	127
5.3.3	Einfluss der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Entwicklung eines Lungenemphysems in Mäusen	128

5.3.4	Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie und den pulmonal-vaskulären Umbau (<i>Remodeling</i>).....	130
5.3.5	Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Serotonin-Konzentration im Plasma von 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen.....	134
5.3.6	Kompartiment-spezifische Expression der Serotoninrezeptoren 5-HTR _{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) nach präventiver Behandlung mit Tergurid und 8-monatiger Rauch-Exposition.....	137
5.3.7	Expression von 3-Nitrotyrosin im Lungenhomogenat von präventiv behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauch-Exposition	139
5.4	Wirkung von Serotonin und Tergurid auf Zelltyp-spezifische Apoptose und Proliferation	140
5.5	Mögliche Effekte von Tergurid als Dopamin-Agonist und Adrenozeptor-Antagonist in COPD	142
5.6	Fazit.....	144
5.7	Ausblick	145
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	146
7	SUMMARY	148
8	LITERATURVERZEICHNIS	150
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	172
10	TABELLENVERZEICHNIS	175
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	176
12	DANKSAGUNG	177
13	LEBENS LAUF	179

13.1	Persönliche Daten	179
13.2	Schulbildung	179
13.3	Studium	179
13.4	Stipendien und Auszeichnungen.....	179
14	WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	180
14.1	Veröffentlichungen	180
14.2	Kongressbeiträge.....	181
14.2.1	Vorträge.....	181
14.2.2	Poster/Posterdiskussion	181
14.3	Preise.....	182

1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
1N HCl	1 normale Salzsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
5-HTR	Serotoninrezeptoren
5-HTR _{2A}	Serotoninrezeptor der Familie 2 Subtyp A
5-HTR _{2B}	Serotoninrezeptor der Familie 2 Subtyp B
5-HTT	Serotonintransporter (SERT)
Δ/d	Delta

A.	Arteria (Arterie)
AATD	α1-Antitrypsin-Defizienz
Abb.	Abbildung
AEC II	Epithelzellen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikular
α-sma	alpha-smooth muscle actin

B2M	Beta2-Mikroglobulin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C _{dyn}	dynamische Compliance
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRAC	Ca ²⁺ -release-activated channels (Ca ²⁺ -sensitive Kanäle)
CREB	cAMP response element-binding protein (Transkriptionsfaktor)
Ct-Werte	cycle threshold-Werte

DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destiliert
DMEM	Dulbecco's verändertes Adler Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco's Phosphate-buffered Saline

EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-related kinases
<i>et al.</i>	und andere
EU	Europäische Union

F	Forward (Vorwärts)
---	--------------------

FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 second (Einsekundenkapazität)
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktoren)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FVC	forcierte Vitalkapazität
<hr/>	
G	Gauss
g	Gramm
G-CSF	Granulozytenkolonien stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (Globale Initiative für chronisch obstruktive Lungenerkrankungen)
<hr/>	
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hkt	Hämatokrit
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren
<hr/>	
I.E.	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IBS	irritable bowel syndrome (Reizdarmsyndrom)
IGF	Insulin-like Growth Factor (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
<hr/>	
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
<hr/>	
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	knockout
KOH	Kaliumhydroxid

l	Liter
L-5-HTP	L-5-Hydroxytryptophan
log	Logarithmus
LV	linker Ventrikel

m	Meter
M	molar
m ²	Quadratmeter
m ³	Kubikmeter
mA	Milliampere
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLCK	myosin-light-chain-kinase (Myosinkinase)
MLI	Mean linear intersept (mittlerer Abstand zwischen Alveolarsepten)
mm	Millimeter
mM	millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert

n	Anzahl der Messungen
N.	Nervus (Nerv)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN_3	Natriumacid
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
Nr.	Nummer

O_2	Sauerstoff
O_2^-	Superoxid
OH^-	Hydroxylanion
ONOO^-	Peroxynitrit

P	Druck
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Personal Computer
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet derived growth factor (von Blutplättchen freigesetzter Wachstumsfaktor)
pH	Oxoniumionenkonzentration
PH	pulmonale Hypertonie
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	pikomolar
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
ppm	parts per million (Teile von einer Million)
PVDF	Polyvenylidendifluorid
PVR	pulmonalvascular resistance (pulmonal-vaskulärer Widerstand)
R	Reverse (Rückwärts)
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute, UpM)
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktionen
RV	rechter Ventrikel
RVSP	right ventricular systolic pressure (rechtsventrikulärer systolischer Druck)
S	Septum
s.c.	subkutan
SAP	systemic arterial pressure (systemisch-arterieller Druck)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec.	Sekunde
SEM	standard error mean (Standardfehler)
SERT	Serotonintransporter
SIDS	sudden infant death syndrome (plötzlicher Kindstod)
SLPI	Sekretorischer Leukoprotease-Inhibitor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	tris buffered saline with tween (Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor β
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
Trp	Tryptophan
TV	tidal volume (Atemzugvolumen)
U	Units
V	Volt oder Volumen
V.	Vena (Vene)
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskular endothelialer Wachstumsfaktor)
W	Watt
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

2 Einleitung

2.1 Die humane Lunge

2.1.1 Die Anatomie und Physiologie

Die Lunge ist das Atmungsorgan luftatmender Säugetiere. Die wesentliche physiologische Funktion der Lunge stellt der Gasaustausch zwischen der Umgebungsluft und dem Blut des Körpers dar. Dieser Gasaustausch wird als „äußere Atmung“ bezeichnet und umfasst die Gesamtheit aller Vorgänge, die an der Aufnahme des lebensnotwendigen Sauerstoffes und an der Abgabe von Kohlendioxid beteiligt sind. Neben der „äußeren Atmung“ gibt es noch eine „innere Atmung“ oder „Zellatmung“, die alle Vorgänge der biologischen Oxidation in der Zelle (Stoffwechselprozesse, welche dem Energiegewinn der Zellen dienen) beschreibt [1].

Die Säugerlunge ist ein blind endendes, sackartiges Organ, welches in der Brusthöhle (*Cavitas thoracis*) liegt und durch das Zwerchfell (*Diaphragma*) begrenzt wird [2]. Beim Menschen besteht die Lunge aus zwei Lungenflügeln. Der rechte Lungenflügel (*Pulmo dexter*) besteht aus einem oberen Lungenlappen (*Lobus superior*), einem mittlerem Lungenlappen (*Lobus medius*) und einem unteren Lungenlappen (*Lobus inferior*). Der linke Lungenflügel (*Pulmo sinister*) hingegen besteht aus einem oberen Lungenlappen (*Lobus superior*) und einem unteren Lungenlappen (*Lobus inferior*). Die Lungenlappen werden wiederum in Lungensegmente eingeteilt, die jeweils von einem Segmentbronchus versorgt werden. Im rechten Lungenflügel befinden sich 10 Segmente, wohingegen im linken Lungenflügel das 7. Segment fehlt und er somit aus 9 Segmenten besteht. Allgemein ist der linke Lungenflügel etwas kleiner als der Rechte, da auf der linken Körperseite zusätzlich das Herz Raum einnimmt. Die Atemwege der Lunge werden in luftleitendes und respiratorisches Gewebe unterteilt. Die Luft gelangt über die Nase oder über den Mund in die Trachea (Lufttröhre), die sich in zwei Hauptbronchien (*Bronchi principales*) aufteilt. Die zwei Hauptbronchien teilen sich entsprechend der Anzahl der Lungenlappen in die Lappenbronchien (*Bronchi lobares*) und danach weiter in die Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*). Anschließend erfolgt eine Verzweigung in die Bronchi bis hin zu den Bronchioli (terminale Bronchien). Dieser luftleitende (konduktive) Teil der Lunge ist allein für den Transport der Atemluft verantwortlich und wird als anatomischer Totraum des Bronchialsystems bezeichnet. Das sich anschließende respiratorische System besteht aus den respiratorischen Bronchiolen (*Bronchioli respiratorii*), die über Alveolargänge (*Ductuli alveolares*) in Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) mit Alveolen (Lungenbläschen) enden

[3-5]. Circa 300 Millionen Alveolen (Durchmesser ca. 0,3 mm) sitzen an den Endaufzweigungen des Bronchialbaumes. Zusammen mit einem dichten Netz aus Lungenkapillaren bilden sie eine etwa 100 m² große Oberfläche für den Gasaustausch von O₂ und CO₂ [6].

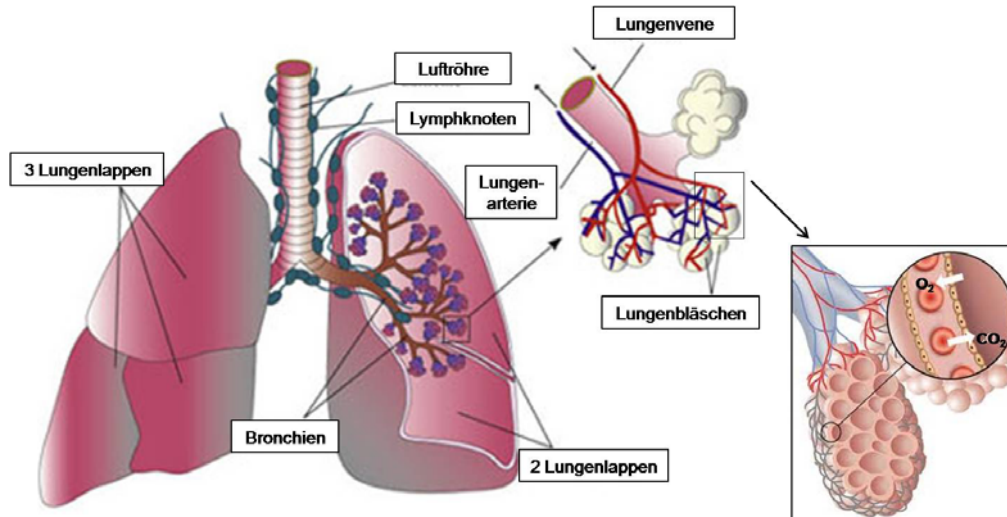


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Lunge und des Austauschs von Sauerstoff (O₂) und Kohlendioxid (CO₂) in den Alveolen (modifiziert nach krebshilfe.net [7] und www.jameda.de [8])

2.1.2 Der Gasaustausch und der Blutkreislauf

Der Gasaustausch der Atemgase erfolgt abwechselnd durch Konvektion (Ventilation/Kreislauf) und Diffusion an dünnen Grenzflächen (Gas/Blut in den Alveolen bzw. Blut/Gewebe in der Peripherie). Konvektion wird durch eine Strömung hervorgerufen, die Teilchen aufgrund von z.B. Schwerkraft, Druckunterschiede, Dichteunterschiede und Konzentrationsunterschiede befördert. Durch den energieverbrauchenden Prozess können so O₂ und CO₂ schnell über lange Strecken transportiert werden. Beim Gasaustausch wird z.B. der Sauerstoff per Konvektion (Strömung der Luft) von der Umgebung in die Lunge und vom Blutkreislauf zu den Muskeln befördert. Bei CO₂ ist es umgekehrt [9, 10].

Der Gasaustausch von O₂ und CO₂ zwischen den Alveolen, dem Blut und den Geweben erfolgt durch passive Diffusion aufgrund der unterschiedlich vorliegenden Partialdrücke. Dabei diffundieren die Gase stets von Arealen mit höherem Partialdruck in Areale mit niedrigerem Partialdruck. In der Atmosphäre beträgt der Partialdruck von Sauerstoff ungefähr 160 mmHg, von Kohlendioxid 0,2 mmHg. In den Alveolen herrscht ein Sauerstoffpartialdruck von ca. 100 mmHg und ein Kohlendioxidpartialdruck von etwa 40 mmHg, so dass O₂ aus der Atmosphäre in die Alveolen und CO₂ aus den Alveolen in die

Atmosphäre diffundiert. Im sauerstoffarmen Blut der Lungenarterien liegt der Partialdruck für O_2 bei ca. 40 mmHg und für CO_2 bei ca. 45 mmHg, so dass das Blut mit O_2 angereichert und CO_2 aus dem Blut in die Alveolen abgegeben wird. Das sauerstoffreiche Blut besitzt nun einen O_2 -Partialdruck von etwa 100 mmHg und einen von CO_2 -Partialdruck von etwa 40 mmHg [5].

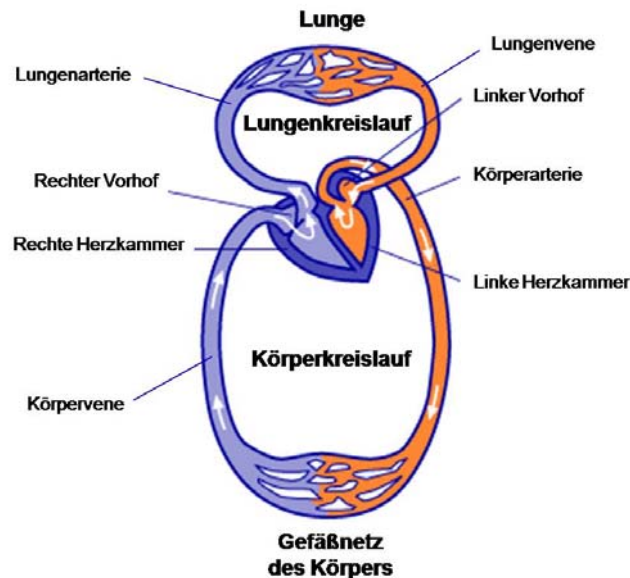


Abbildung 2.2: Lungen- und Körperkreislauf des Blutes

Die Pfeile geben die Fließrichtung des Blutes an; Sauerstoffreiches Blut = orange;
Sauerstoffarmes Blut = blau (modifiziert nach patientenleitlinie.de [11])

Der Blutkreislauf wird in einen Lungenkreislauf (kleiner Kreislauf) und in einen Körperkreislauf (großer Kreislauf) unterteilt. In den Kapillarnetzen der Alveolen wird das Blut mit Sauerstoff angereichert und fließt durch Lungenvenen (*Venae pulmonales*) über den linken Vorhof in den linken Ventrikel des Herzens. Von dort aus wird das arterielle Blut über die Körperarterie (*Aorta*) in den Körperkreislauf gepumpt und versorgt alle Organe mit Sauerstoff. Das nun sauerstoffarme (venöse) Blut strömt durch die Körpervene über den rechten Vorhof in den rechten Ventrikel des Herzens und tritt in den Lungenkreislauf ein. Von dem rechten Ventrikel wird das sauerstoffarme Blut über Lungenarterien (*Arteriae pulmonales*) zu den Kapillarnetzen der Alveolen gepumpt und erneut mit Sauerstoff angereichert (Abbildung 2.2; [5, 9]).

2.1.3 Aufbau der Blutgefäße und Alveolen

Die Blutgefäße des Blutkreislaufs werden in Aorta (Hauptschlagader), Arterien (Schlagadern), Arteriolen (kleine Schlagadern), Kapillaren (Haargefäße), Venolen (kleine Venen), Venen (Blutadern) und Hohlvenen (*Vena cava superior/inferior*) eingeteilt. Die Wand einer Vene besteht aus den folgenden drei Schichten:

- *Tunica adventitia* bzw. *externa* (äußere Schicht): im Wesentlichen Fibroblasten
- *Tunica media* (mittlere Schicht): glatte Muskelzellen und elastische Fasern
- *Tunica intima* (innere Schicht): Endothelzellen und elastische Bindegewebsfasern

Arterien haben zusätzlich zwischen den einzelnen Schichten noch eine elastische Faserschicht (*Membrana elastica interna* und *Membrana elastica externa*). Die Muskelschicht der Arterien ist deutlich dicker als die der Venen. Arterien können durch vasodilative oder vasokonstriktive Impulse ihren Durchmesser verändern und so zur Regulation des Blutdruckes beitragen. Kapillaren hingegen bestehen nur aus einer Schicht Endothelzellen (*Tunica intima*), die einer Basallamina aufsitzt, was den Gasaustausch erleichtert (Abbildung 2.3, links) [4].

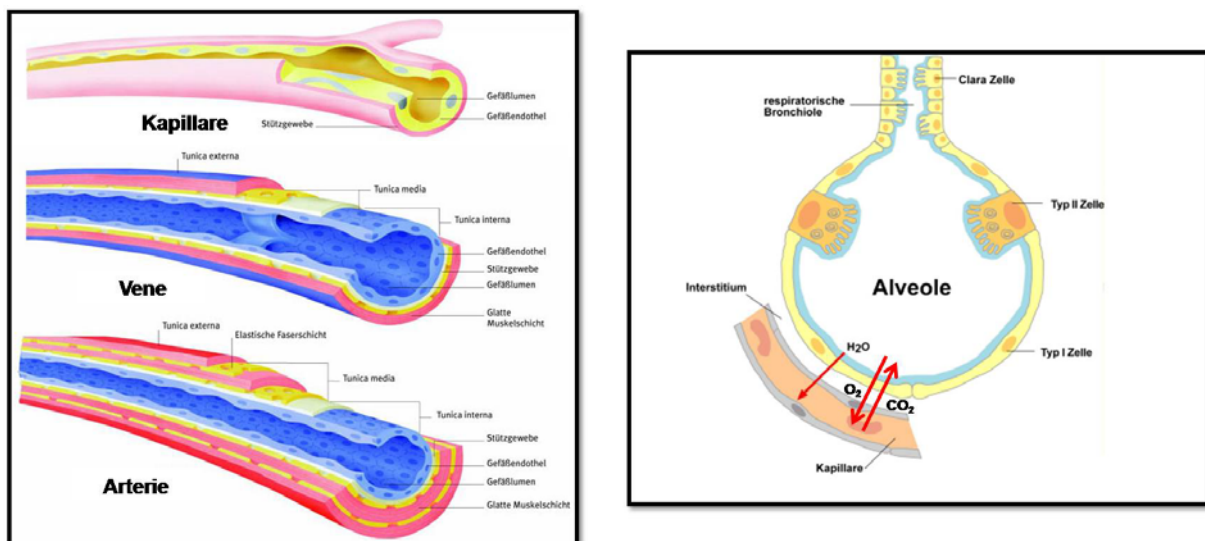


Abbildung 2.3: Aufbau von Gefäßen und Alveolen

Links ist der Aufbau einer Kapillare, Vene und Arterie (verändert nach wissen.de [12]) und rechts ist der Aufbau einer Alveole (modifiziert nach Matthay, Robriquet & Fang, 2005 [13]) dargestellt.

Das Atemwegsepithel besteht aus polaren Epithelzellen (kubische Zellen und Clara-Zellen). Das alveoläre Epithel setzt sich aus teilungsunfähigen, ausdifferenzierten, flachen und langgezogenen alveolären Typ I-Zellen (AT I) und aus kubischen alveolären Typ II-Zellen (AT II) zusammen (Abbildung 2.3, rechts). Zur Oberflächenvergrößerung haben AT II-Zellen Mikrovilli und produzieren *Surfactant*. *Surfactant* ist eine emulgierende, oberflächenaktive Substanz, welche die Oberflächenspannung reduziert und somit die Alveolen offen hält, so dass der Gasaustausch ermöglicht sowie erleichtert wird. Zusammen mit den Blutkapillaren bilden die alveolären Typ I-Zellen die Blut-Luft-Schranke [4]. Die Diffusionstrecke der Atemgase beträgt ungefähr 1-2 μm , wobei die alveolare-kapillare Membran bis zu 0,2 μm dünn sein kann [6].

2.1.4 Ventilation der Lunge und Spirometrie

Um einen Gasaustausch zwischen den Alveolen und dem Blut zu gewährleisten, muss die Lunge ventilieren. Dies geschieht durch Einatmen (Inspiration) und Ausatmen (Expiration). Der Mechanismus der Ventilation basiert auf einer Unterdruckatmung [5]. Dies bedeutet, dass sich das Volumen der Lunge passiv an das Thoraxvolumen anpasst. Bei der Inspiration kommt es zu einer Kontraktion der Zwischenrippenmuskeln und der Brustkorb erweitert sich. Zusätzlich kontrahiert das Zwerchfell und senkt sich nach unten ab. Beide Prozesse erhöhen das Thoraxvolumen und somit auch das Lungenvolumen [9]. Bei der Expiration entspannen sich die Zwischenrippenmuskeln und das Zwerchfell, was folglich zu einer Reduzierung des Lungenvolumens führt. Bei körperlicher Aktivität kann das Ventilationsvolumen durch ein Einwirken weiterer Muskelpartien (z.B. in Hals, Rücken und Brust) erhöht werden. Allgemein wird die Atmung durch das Atemzentrum im Gehirn gesteuert [5].

Als Atemzugvolumen wird die Luftmenge bezeichnet, die ein- und ausgeatmet wird. Bei einem ruhenden Menschen beträgt diese ca. 500 ml [5]. Das direkt am Gasaustausch beteiligte Volumen wird als alveoläres Ventilationsvolumen (ca. 350 ml/Atemzug) bezeichnet und entspricht dem Atemzugvolumen abzüglich des anatomischen Totraums. Die Vitalkapazität gibt das maximale Luftvolumen an, dass ein-und ausgeatmet werden kann und beträgt beim Mensch ca. 4,5 - 5,5 Liter. Um ein Kollabieren der Alveolen beim Ausatmen zu vermeiden, bleibt stets ein Residualvolumen (1000-1500 ml) zurück. Das Residualvolumen gliedert sich auf in das Kollapsvolumen, die Menge an Luft, die entweicht, wenn die Pleuralkopplung aufgehoben wird (z.B. beim Pneumothorax), und das Minimalvolumen, was nach Zusammenfall der Lunge noch in ihr enthalten ist. Das Residualvolumen kann jedoch bei Lungenerkrankungen, wie z.B. einem Emphysem zunehmen und führt zu einer Abnahme der

Vitalkapazität [4, 9]. Das gesamte Volumen in der Lunge, inklusive Residualvolumen, wird als Totalkapazität bezeichnet. Das inspiratorische Reservevolumen und das Atemzugsvolumen stellen zusammen die Inspirationskapazität dar. Das expiratorische Reservevolumen und das Residualvolumen ergeben zusammen die funktionelle Residualkapazität [2]. In der Pneumologie wird die Lungenfunktion mittels Spirometrie gemessen und dient zur Diagnose von Lungenkrankheiten (Abbildung 2.4).

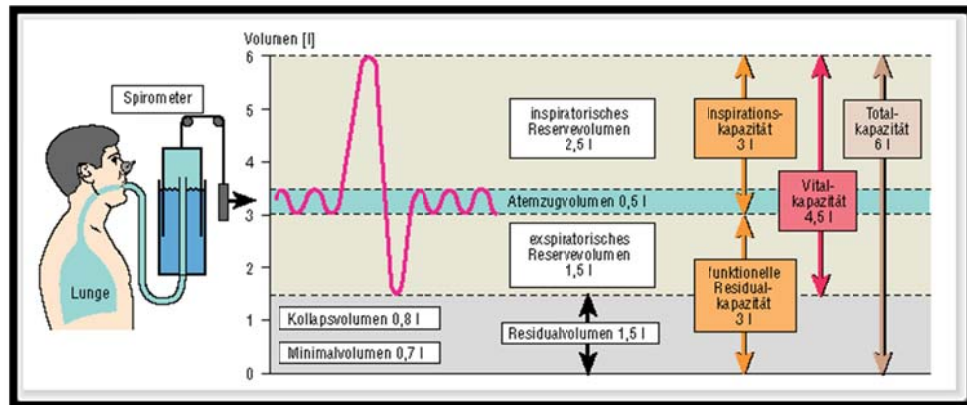


Abbildung 2.4: Messung der Atemvolumina mit einem Spirometer

Die zu untersuchende Person atmet in einem geschlossenen System, so dass die Atembewegungen durch ein Heben und Senken der Glocke aufgezeichnet werden kann. Veränderungen des Lungenvolumens bei der Atmung können so quantitativ erfasst werden (Quelle des Bildes: Roche Lexikon der Medizin [14]) [2, 9].

Mit Hilfe der Spirometrie kann unter anderem auch die Einsekundenkapazität (FEV_1 , „*Forced Expiratory Volume in 1 second*“) ermittelt werden. Nach einer maximalen Inspiration atmet der Patient so schnell wie möglich aus und das Volumen wird eine Sekunde lang gemessen. Das maximal expirierte Volumen wird als forcierte Vitalkapazität (FVC) bezeichnet. Das Verhältnis FEV_1/FVC beträgt normalerweise $> 75\%$. Liegt der Wert deutlich unter dem Normalwert kann dies ein Indiz für Lungenerkrankungen wie z.B. COPD oder Fibrose sein. Eine veränderte Struktur des Lungengewebes kann ein weiterer Hinweis für Lungenerkrankungen sein. Ermittelt wird der Zustand der Lunge durch die Parameter der Compliance, der Resistance und der Elastizität. Compliance beschreibt die Dehnbarkeit des Atemapparates und wird als Verhältnis von Volumenzunahme zu Druckzunahme definiert. Eine erhöhte Compliance kann zum Beispiel ein Hinweis für eine Emphysementwicklung in der Lunge sein. Der für den Atemstrom erforderliche Druckgradient ist proportional der „Resistance“ (Atemwegswiderstand) und dient als Maß für eine zentrale

Atemwegsobstruktion. Die Elastizität der Lunge setzt sich aus der Wandelastizität des Organs und der Alveolenelastizität zusammen. Aufgrund der Oberflächenspannung der kleinen Alveolen neigen diese dazu, ihre innere Oberfläche zu verkleinern. Um diesem Prozess entgegen zu wirken, werden die Alveolen durch sogenanntes *Surfactant* (oberflächenaktive Substanzen) gemischt mit einem Flüssigkeitsfilm ummantelt, was die Oberflächenspannung der Alveolen reduziert. Eine veränderte Elastizität der Lunge ist ein weiteres Merkmal für eine Lungenerkrankung [9].

2.2 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

2.2.1 Definition

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*; COPD) wird durch eine Einschränkung des Atemflusses charakterisiert und kann derzeit nicht geheilt werden. Die Einschränkung des Atemflusses erfolgt meistens progressiv und wird mit einer erhöhten chronischen, entzündlichen Immunantwort der Atemwege bzw. der gesamten Lunge auf schädliche Partikel und Gase in Verbindung gebracht [15-19].

Die Atemwegslimitation wird durch Veränderungen der zentralen Atemwege (chronische Bronchitis), der peripheren kleinen Atemwege (obstruktive Bronchiolitis, *small airway disease*) und im Lungenparenchym (Emphysem) verursacht, wobei das Ausmaß des Erscheinungsbildes von Patient zu Patient variiert. Eine chronische Entzündung führt zu strukturellen Veränderungen und Verengungen (Obstruktion bis zum völligen Verschluss) der kleinen Atemwege (*small airways*) resultierend in Atemwegsfibrose, luminale Verstopfung durch übermäßige Schleimproduktion und in einem erhöhten Atemwegswiderstand. Des Weiteren bewirkt diese chronische Entzündung eine Destruktion des Lungenparenchyms, was zu einem Verlust der alveolären Verbindungen an die kleinen Atemwege, sowie zu einer Vergrößerung des Luftraums (Emphysem) in der Lunge führt, was die Lungenelastizität stark vermindert [19, 20]. Eine Zusammenfassung der Mechanismen zur Einschränkung des Atemflusses in einem peripheren Lungengewebe von Patienten mit COPD im Vergleich zu einem gesunden Menschen wird anhand von Abbildung 2.5 schematisch verdeutlicht.

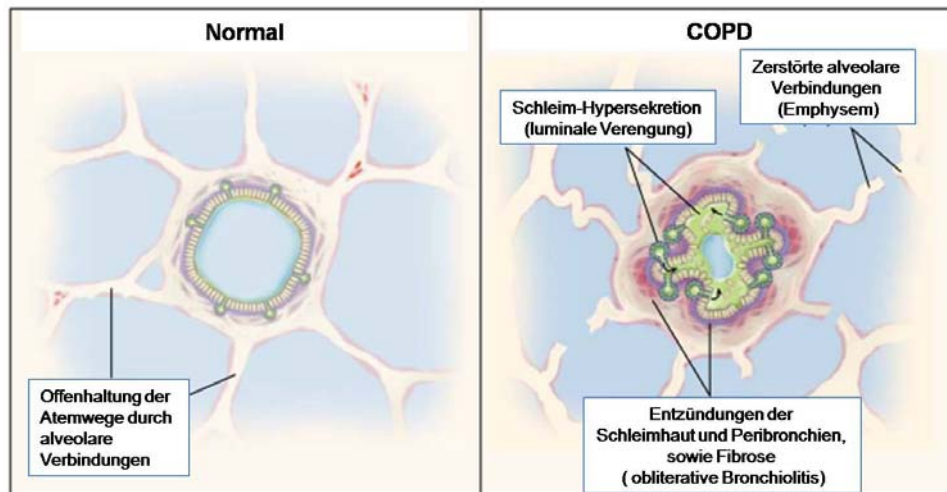


Abbildung 2.5: Mechanismen der Limitation des Atemflusses in COPD

(modifiziert nach Peter J. Barnes, 2000 [16])

Die typischen Beschwerden der COPD werden als „AHA“-Symptome bezeichnet [21]:

- Auswurf (beim Husten hervorgebrachter Schleim aus den Atemwegen),
- **H**usten (vor allem am frühen Morgen),
- **A**temnot (anfänglich nur unter körperlicher Belastung, später auch in Ruhe).

In der Diagnostik wird die Lungenfunktion von Patienten spirometrisch ermittelt (siehe Kapitel 1.1.3), womit der Grad der Limitation des Atemwegsflusses untersucht werden kann. Dabei werden vor allem die Veränderung der Einsekundenkapazität (FEV_1) und das Verhältnis zwischen der FEV_1 zur forcierten Vitalkapazität (FVC) erfasst (Erklärung siehe Abschnitt 1.3). Mit Hilfe der spirometrischen Auswertung in Verbindung mit dem körperlichen Befinden und der „AHA“-Symptome eines COPD-Patienten teilt die „*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*“ (GOLD) die COPD in vier Schweregrade (GOLD Stufe I-IV) ein (Tabelle 2.1). Hierbei beschreibt Stufe 0 Patienten mit einer chronischen Bronchitis, die eine normale Spirometrie aufzeigen. Solche Patienten werden als gefährdet eingestuft, da eine chronische Bronchitis vor oder nach der Entwicklung einer Atemwegslimitation entstehen kann und möglicherweise mit der Entwicklung und/oder Beschleunigung dieser Limitation in Verbindung gebracht werden kann [19].

Tabelle 2.1: Klassifizierung der Schweregrade der COPD nach GOLD

(GOLD: *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*; FEV_1 = Einsekundenkapazität → forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Ausatemungssekunde; FVC = forcierte Vitalkapazität; modifiziert nach GOLD Workshop Report 2013- www.goldcopd.org)

Schweregrad	FEV_1/FVC (%)	FEV_1 (%)	Symptome
Stufe 0 (gefährdet)	> 70 % (normal)	> 80 % (normal)	Chronische Symptome (Husten und Auswurf)
Stufe I (leichte COPD)	< 70 %	> 80 %	mit/ohne Symptome (Husten, Auswurf)
Stufe II (mittlere COPD)	< 70 %	50 - 80 %	mit/ohne chronischer Symptome (Husten, Auswurf, Kurzatmigkeit)
Stufe III (schwere COPD)	< 70 %	30 – 50 %	mit/ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Kurzatmigkeit)
Stufe IV (sehr schwere COPD)	< 70 %	< 30 %	Ateminsuffizienz oder Rechtsherzinsuffizienz; Lebensqualität stark beeinträchtigt, Exazerbationen können lebensbedrohlich sein

2.2.2 Epidemiologie

Derzeit ist COPD die weltweit häufigste Ursache für eine hohe Morbidität und Mortalität resultierend in einer zunehmenden hohen wirtschaftlichen als auch sozialen Belastung [19, 22, 23]. Im Jahre 1990 galt COPD als sechst häufigste Todesursache weltweit und wird nach gegenwärtigen Hochrechnungen der WHO im Jahre 2030 auf den dritten Platz gelangen. Spekulationen beschreiben, dass die Sterblichkeitsrate durch COPD im Jahre 2030 voraussichtlich den vierten Platz einnehmen wird [23]. Das Ausmaß der Häufigkeit, Morbidität und Mortalität der COPD variiert von Land zu Land. Der Grund dafür liegt in den unterschiedlichen Einflüssen der COPD-Risikofaktoren auf eine Population [24]. Ein Anstieg der Häufigkeit und Morbidität der COPD-Erkrankungen wird zusätzlich mit der steigenden durchschnittlichen Lebenserwartung der Menschheit in Verbindung gebracht [23, 25]. Des Weiteren kann die tatsächliche Häufigkeit der COPD-Erkrankung aufgrund des komplexen Krankheitsbildes, der fehlenden Kenntnisse und Diagnosen nicht eindeutig dargelegt werden [26]. Dennoch kann festgehalten werden, dass COPD von 1990 bis 2004 häufiger in Rauchern und Ex-Rauchern als in Nicht-Rauchern aufgetreten ist [26, 27].

Das Morbiditätsrisiko wird zusätzlich durch Begleiterkrankungen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Beeinträchtigungen des Bewegungsapparates und Diabetes mellitus Typ II beeinflusst [19, 28]. Nicht desto trotz wird deutlich, dass sich die Mortalitätsrate durch COPD

in den letzten 30 Jahren enorm erhöht hat, wohingegen sich die Sterblichkeitsraten von z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und anderen Krankheiten durch neue innovative Behandlungen verringert haben [29]. COPD stellt eine hohe wirtschaftliche Belastung dar. Derzeit werden die Kosten für COPD in Europa auf 38,6 Milliarden Euro geschätzt [19].

2.2.3 Risikofaktoren

Das Risiko für eine Entwicklung der COPD hängt mit der Interaktion von genetischen Faktoren und verschiedenen Umwelteinflüssen zusammen, die wiederum durch Begleiterkrankungen beeinflusst werden können [30]. In Abbildung 2.6 sind die wichtigsten Risikofaktoren der COPD dargestellt.

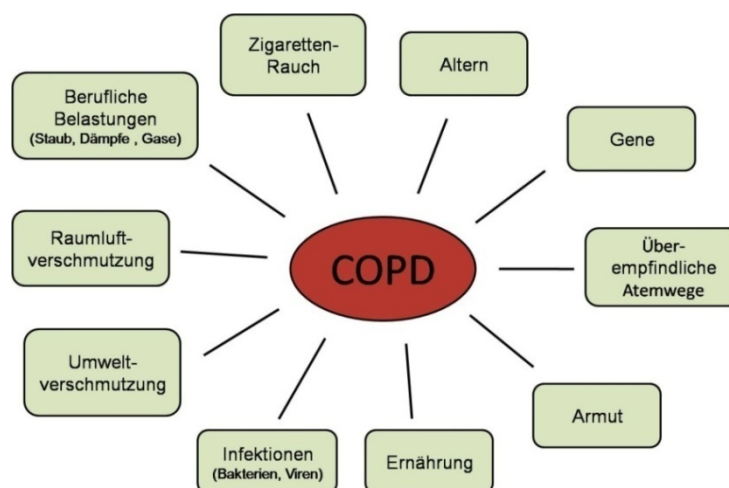


Abbildung 2.6: Risikofaktoren der COPD

2.2.3.1 Zigarettenrauch

Weltweit scheint die Hauptursache für COPD die Inhalation von Zigarettenrauch zu sein. Die WHO schätzt, dass in einkommensstarken Ländern 73 % der COPD-Sterblichkeitsrate in Verbindung mit Zigarettenrauch steht, wohingegen es in Ländern mit niedrigem bis mittleren Einkommen auf 40 % geschätzt wird [30]. Allgemein neigen Raucher häufiger zu Entzündungen der Atemwege, zeigen eine veränderte Lungenfunktion und einen schnelleren Abfall der FEV₁ [29]. Zudem wurde gezeigt, dass auch passives Rauchen durch Inhalation von Partikeln und Gasen zu Entzündungen im respiratorischen Trakt und zur Entwicklung von COPD führen kann [31-33]. Der genaue Einfluss von Zigarettenrauch auf die Entstehung der COPD ist derzeit nicht vollständig geklärt. Tabakrauch enthält tausende schädliche Substanzen. Neben Nikotin, Schwermetallen und krebserregenden Substanzen führt Rauch

auch zu einem Anstieg von freien Radikalen (Superoxid, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit), welche die Entstehung einer COPD fördern können [34]. Dennoch entwickeln nur ca. 10 % - 20 % der Raucher eine COPD, so dass andere Risikofaktoren ebenfalls in die Pathogenese der COPD mit einbezogen werden müssen [35].

2.2.3.2 Berufliche Belastungen, Umwelt- und Raumluftverschmutzungen

Eine Inhalation von verschiedenen Dämpfen, Chemikalien, Stäuben oder Gasen am Arbeitsplatz wird oft ebenfalls mit einer Erkrankung von COPD in Verbindung gebracht. Zu diesen Arbeitsbereichen zählen z.B. Landwirtschaft, Bergbauindustrie, Textil-, Plastik-, Gummi- und Nahrungsmittelfabriken, sowie die Reparation und Herstellung von Maschinen [24]. Man nimmt an, dass knapp 20 % aller COPD-Fälle durch eine Belastung am Arbeitsplatz entstehen [36, 37].

Dagegen schätzte die WHO, dass gerade mal 1 % der COPD-Fälle in Industrieländern in Folge von Umweltverschmutzung auftreten [38]. Dennoch wird eine verringerte Lungenfunktion auch mit städtischen Umweltverschmutzungen durch Verbrennung fossiler Energieträger und Abgasen in Verbindung gebracht [39].

Im Gegensatz zu den anscheinend geringen Auswirkungen allgemeiner Umweltverschmutzung, stellt Raumluftverschmutzung ein erhöhtes Risiko für COPD in Entwicklungs- und Schwellenländern dar. Die Verbrennung von Biobrennstoffen, wie Kohle, Stroh, Dünger und Holz, wird in solchen Ländern oft zum Heizen oder Kochen in schlecht durchlüfteten Häusern verwendet, so dass dort ca. 35 % der COPD-Fälle aufgrund dieser Ursachen entstehen [24, 30].

2.2.3.3 Genetische Faktoren

Ein bekannter genetischer Defekt, der zur Entwicklung von COPD führt, ist der α 1-Antitrypsin-Mangel. Durch ein α 1-Antitrypsin-Defizit unterliegt das Lungengewebe einem verstärkten proteolytischen Abbau durch neutrophile Elastasen und führt so zur Ausbildung eines panlobulären Emphysems [40, 41]. Allerdings weisen nur 1-3 % aller COPD-Patienten einen α 1-Antitrypsin-Mangel auf [30]. Andere Studien besagen, dass Polymorphismen von Genen der Matrix-Metalloproteinasen MMP1, MMP9 und MMP 12 an der Abnahme der Lungenfunktion beteiligt sind [42, 43]. Des Weiteren beschreiben Untersuchungen, dass z.B. Polymorphismen von Genen des Tumor Nekrose Faktors α (TNF- α , Zytokin des Immunsystems), der transformierende Wachstumsfaktor β (TNF- β , Regulation vieler zellulärer

Prozesse) und andere mit der Entwicklung einer COPD in Verbindung gebracht werden [30, 44]. Der genaue Einfluss von Genpolymorphismen ist zurzeit unklar.

2.2.3.4 Andere Risikofaktoren

Aufgrund verbesserter Hygiene, Ernährung und klinischer Versorgung, sowie Früherkennung und Behandlung von diversen Krankheiten (z.B. akute Infektionen, Herzerkrankungen) wird die Weltbevölkerung immer älter. Eine längere Lebensdauer kann das Risiko für eine COPD erhöhen, da sich mit dem Älterwerden auch die Lungenfunktion verschlechtert [30, 45].

Virale und bakterielle Infektionen können ebenfalls bei der Pathogenese und der Progression von COPD mitwirken und sind hauptverantwortlich für akute Exazerbationen der Erkrankung [46, 47]. Menschen, die während ihrer Kindheit schwere Infektionen der Atemwege hatten, neigen zu einer reduzierten Lungenfunktion und haben im Erwachsenenalter oft Erkrankungen der Atemwege, so dass auch dieses ein Risikofaktor für COPD sein kann [48]. Menschen mit einer Überempfindlichkeit der Bronchien, Asthma oder einer chronischen Bronchitis können ebenfalls ein höheres Risiko für eine Erkrankung an COPD haben [49-51]. Bevölkerungen, die in Armut leben, sind gleich mehreren Risikofaktoren für eine COPD ausgesetzt. Gründe dafür sind: schlechte Hygiene, frühe respiratorische Infektionen, schlechter Ernährungszustand, berufsbezogene Risiken und starke häusliche Belastung durch Zigaretten, Verbrennung von Biomasse zum Kochen und Heizen, sowie anderen Luftverschmutzungen im Raum [24].

2.2.4 Pathophysiologie der COPD

Das Erscheinungsbild der COPD beinhaltet sowohl anatomische als auch funktionelle Läsionen (Abbildung 2.7):

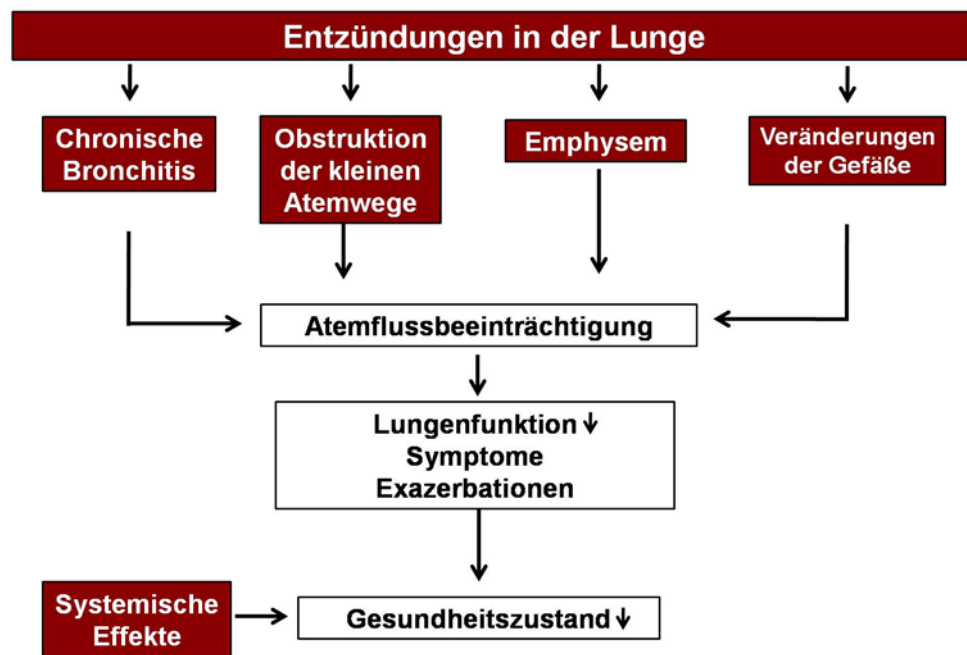


Abbildung 2.7: Pathophysiologie der COPD (modifiziert nach Vogelmeier [52])

2.2.4.1 Chronische Bronchitis

Eine chronische Bronchitis wird laut der WHO (*World Health Organisation*) als eine vermehrte Sekretproduktion der Bronchien mit produktivem Husten über mindestens drei Monate eines Jahres in zwei aufeinander folgenden Jahren definiert [17, 19]. Bei einer chronischen Bronchitis ist das bronchiale Epithel der zentralen Atemwege stark entzündet, was zu einer erhöhten Schleimproduktion, einer Vergrößerung der schleimproduzierenden Drüsen, eine Verdickung der bronchialen Wand und zu einer Störung der epithelialen Barrierefunktion führt. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die verminderte mukoziliäre *Clearance* (Selbstreinigung der Lunge) aufgrund einer Zurückbildung der Zilien des Flimmerepithels. Dadurch kann der bronchiale Schleim nicht mehr zum Rachen transportiert werden, so dass er aktiv abgehustet werden muss [53, 54]. Eine erhöhte bronchiale Schleimbildung fördert eine Infektanfälligkeit, was zu erneuten Entzündungen der Bronchien führen kann. In Folge dessen kann es zu Verengungen und Veränderungen der peripheren Atemwege kommen [55, 56].

2.2.4.2 Obstruktion der kleinen Atemwege

Eine Obstruktion der kleinen Atemwege (*small airway obstruction*) (< 2 mm Innendurchmesser) gehört zu den Hauptmerkmalen der COPD und bringt eine enorme

Einschränkung des Atemflusses mit sich. Eine Verengung der kleinen Atemwege basiert auf mehreren Mechanismen: Zum einen wird die erhöhte Schleimbildung im Zuge der chronischen Bronchitis in die peripheren Atemwege aspiriert und führt zu einer luminalen Okklusion der kleinen Atemwege. Zum anderen kommt es zu einer erhöhten Bildung lymphoidaler Follikel, die sich in der Adventitia der Gefäße ansammeln und die Dicke des Gewebes zwischen der glatten Muskulatur und dem Lumen erhöhen. Der Durchmesser der kleinen Atemwege wird beeinträchtigt und der Atemwegswiderstand erhöht sich. Des Weiteren wird eine Verdickung der Alveolarwand durch eine Einwanderung von Entzündungszellen, Hyperplasie der glatten Muskelzellen und zunehmende peribronchiale Fibrosierung beschrieben. Zusätzlich kommt es zu einer Abnahme von Kollagen in den äußeren Wänden der Luftwege, was dazu führt, dass sich die Luftwege weniger weit öffnen lassen [20, 53, 57].

2.2.4.3 Emphysem

Ein Emphysem ist charakterisiert durch eine abnormale, permanente Vergrößerung des Luftraumes distal der terminalen Bronchiolen, aufgrund einer Zerstörung des Lungenparenchyms und einem damit verbundenen Elastizitätsverlust des Lungengewebes [58]. Man unterscheidet zwischen einem zentrilobulären und einem panlobulären (panazinärem) Emphysem. Das zentrilobuläre Emphysem resultiert aus einer Ausdehnung und einer Zerstörung der respiratorischen Bronchiolen vor allem in den oberen Lungenlappen und in dem oberen Bereich der unteren Lungenlappen. Diese Form des Emphysems wird häufig mit Zigarettenrauch in Verbindung gebracht [48]. Das panlobuläre Emphysem beschreibt die Ausdehnung und Zerstörung der Azini (bestehend aus Alveolen und Ductus alveolares) im unteren Lungenlappen und ist häufig bei α 1-Antitrypsin-Mangel zu beobachten [54, 58].

Allgemein führt eine Zerstörung des Lungenparenchyms zu einem Verlust von Alveolen. Es entstehen große Lufträume in der Lunge, die bei Expiration die Atemluft einschließen (*air trapping*). Es kommt zu einer Hyperinflation der Lunge, wobei das Residualvolumen zunimmt und die Vitalkapazität abnimmt. Folglich kommt es zur Atemnot. Des Weiteren kann der Verlust von Alveolen zu einem Kollabieren der kleinen Atemwege führen. Ein weiterer negativer Aspekt eines Emphysems ist der gestörte Gasaustausch zwischen den Alveolen und dem Blut resultierend in einer Unterversorgung des Körpers mit Sauerstoff [20, 54, 59].

2.2.4.4 Gefäßveränderungen

In COPD-Patienten wurden, zusätzlich zur Obliteration der Atemwege, auch ein pulmonalvaskuläres *Remodeling* und eine pulmonale Hypertonie (PH) beobachtet. Eine PH ist durch einen zunehmenden Anstieg des Gefäßwiderstandes gekennzeichnet, der zu einer Hypertrophie des rechten Herzens führt. Es kommt zu einem damit verbundenen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf. Charakterisiert wird die PH durch einen pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozess und eine in manchen Klassen auftretende übermäßige Vasokonstriktion. Beim pulmonalvaskulären *Remodeling* kann es in Abhängigkeit der PH-Form zu einer Verdickung der *Tunica media* aufgrund einer Hyperplasie der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen kommen. Zusätzlich kann es zu einer Dysfunktion des Endothels resultierend in einer intimalen Verdickung und einer Reduktion des Gefäßlumens kommen. Des Weiteren wurden auch fibrotische Veränderungen in der Intima muskularisierter Arterien beschrieben [54, 59-61].

2.2.4.5 Systemische Effekte

Neben den pulmonalen Veränderungen der COPD gibt es mehrere klinisch relevante lokale und systemische Effekte, die bei der Klassifikation und im Umgang dieser Krankheit helfen. Viele COPD-Patienten zeigen einen erheblichen Gewichtsverlust bis hin zur Abmagerung, eine Dysfunktion der Skelettmuskulatur (Muskelschwäche und Muskelabbau), Osteoporose, Atherosklerose, Herzerkrankungen, Tumorleiden und Depressionen. Folglich kommt es zu einer starken Limitierung der Beweglichkeit und der Lebensqualität. Durch Beachtung dieser systemischen Komponenten kann die Lebensqualität der COPD-Patienten durch spezielle Ernährungsstrategien, Trainingseinheiten und Rehabilitationsprogramme deutlich gesteigert, aber nicht geheilt werden [52, 56].

2.2.5 Pathogenese der COPD

Die genaue Pathogenese der COPD ist derzeit noch nicht genau entschlüsselt. In den letzten Jahren wurde an dem Krankheitsverlauf der COPD sehr viel geforscht und viele neue Erkenntnisse gewonnen. Nach dem aktuellen Wissensstand haben mehrere Mechanismen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der COPD. Zu den Hauptmechanismen gehören wahrscheinlich Inflammation, Protease-Antiprotease-Dysbalance, oxidativer Stress und Apoptose. All diese Faktoren können sich wechselseitig stark beeinflussen und negativ

verstärken. Man geht deshalb davon aus, dass die Abnahme der Reversibilität als auch die Zunahme der Destruktion der Atemwege und des Lungengewebes parallel verlaufen [52].

2.2.5.1 Inflammation

Der Einfluss der Inflammation und den beteiligten Zellen auf die Erkrankung der COPD wird in Abbildung 2.8 dargestellt.

Zigarettenrauch und andere schädliche Noxen aktivieren alveolare Makrophagen und Epithelzellen, die chemotaktische Faktoren (z.B. Interleukin 8, Leukotrien B4) ausschütten und von Neutrophilen aufgenommen werden. Daraufhin geben Neutrophile als auch Makrophagen selbst Proteasen (z.B. neutrophile Elastase, Cathepsine, Matrixmetalloproteasen (MMPs) [62, 63]) ab, welche das Bindegewebe im Lungenparenchym abbauen (Emphysembildung), die mukoziliäre *Clearance* reduzieren [64] und die Mukussekretion anregen. Normalerweise werden Proteasen durch Proteaseinhibitoren [α 1-Antitrypsin, Sekretorische Leukoprotease-Inhibitor, *tissue inhibitor of MMPs* (TIMPs)] im Gleichgewicht gehalten. Des Weiteren könnten zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ -Lymphozyten) in die inflammatorischen Kaskade verwickelt sein, jedoch konnte dieses noch nicht genau identifiziert werden [16].

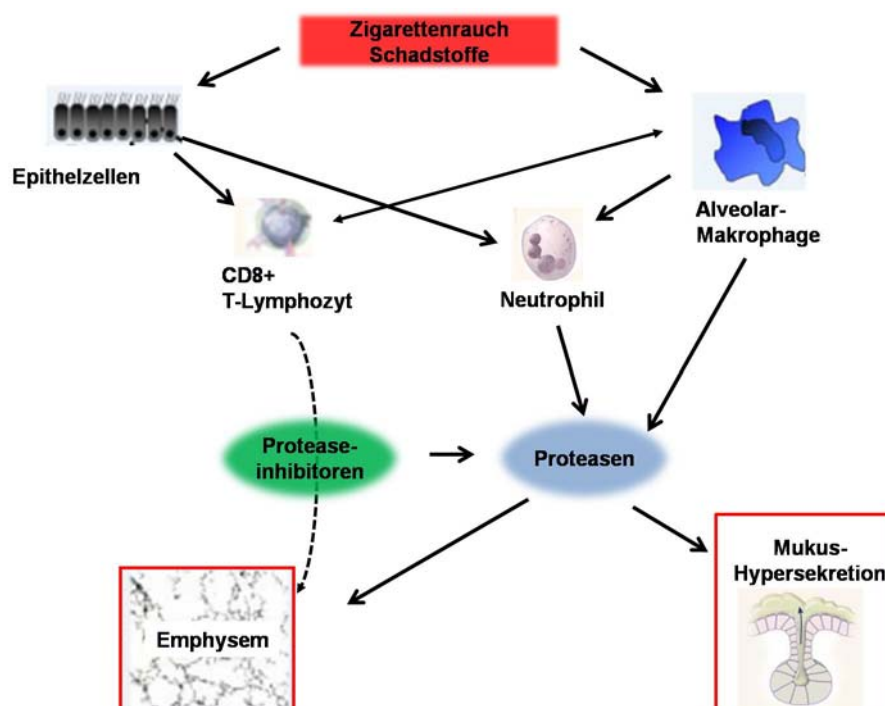


Abbildung 2.8: An der COPD-Entzündung beteiligte Zellen und pathologische Effekte (modifiziert nach Barnes und Vogelmeier [16, 52])

Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems und phagozytieren körperfremde Mikroorganismen wie Bakterien und Viren. Sie gehören zu den Phagozyten (Fresszellen) der Leukozyten (weiße Blutkörperchen) [65]. Studien konnten zeigen, dass die Anzahl der Makrophagen in den Atemwegen, dem Lungenparenchym, der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Sputum mit dem Schweregrad der COPD zusammenhängen und um das 5 - 10 fache höher konzentriert sein können. So wird den Makrophagen eine dominante Rolle in der Pathogenese der COPD zugeschrieben. In Patienten mit einem Emphysem konnte eine Lokalisierung von Makrophagen an den zerstörten Wänden der Alveolen beobachtet werden [17, 66].

Die neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) sind mit einem Anteil von 50 – 65 % die häufigsten weißen Blutkörperchen und sind genau wie Makrophagen Teil der angeborenen Immunabwehr. Als kurzlebige Phagozyten dienen sie der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen [65]. COPD-Patienten weisen eine erhöhte Anzahl an aktivierten Neutrophilen im Sputum und BAL-Flüssigkeit auf [17, 67]. Da Neutrophile schnell durch die Atemwege und das Lungenparenchym wandern können, konnte dort keine erhöhte Anzahl festgestellt werden [52, 68]. Durch die Freisetzung von Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Granulozytenkolonien-stimulierenden-Faktor (G-CSF) aus den Makrophagen kann Zigarettenrauch einen direkten Effekt auf die Granulozyten-Produktion im Knochenmark haben und zu einer erhöhten Retention von Neutrophilen in der Lunge führen [69]. Neutrophile können innerhalb der pulmonalen Zirkulation aktiviert werden, ROS und Proteasen freisetzen und so direkt zu einer Schädigung führen [52]. Sie heften sich unter Kontrolle von Leukotrien B₄ und Interleukin-8 an Epithelzellen und wandern in die Atemwege der Lunge. Die Überlebensrate der Neutrophile in den Atemwegen könnte durch den Einfluss der Cytokine GM-CSF und G-CSF erklärt werden [17]. Veröffentlichungen zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an zirkulierenden Neutrophilen und dem Abfall des FEV₁ besteht [70] und die Menge in Bronchial-Biopsien und Sputum mit dem Schweregrad der COPD korreliert [71].

Eine erhöhte Anzahl an T-Lymphozyten konnte im Lungenparenchym, den peripheren und zentralen Atemwegen von COPD-Patienten beobachtet werden, wobei die zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) gegenüber den T-Helferzellen (CD4⁺) dominieren [72]. T-Lymphozyten gehören ebenfalls zu den weißen Blutzellen und stellen gemeinsam mit den B-Lymphozyten die erworbene (adaptive) Immunantwort dar [65]. Man geht davon aus, dass die CD8⁺-Zellen vermehrt Granzyme und Perforin ausschütten, die eine Apoptose der alveolaren Zellen in den

Lungen von COPD-Patienten induzieren und so eine Rolle bei der Emphysementwicklung spielen könnten [35].

2.2.5.2 Proteasen-Antiproteasen-Dysbalance

Die Protease-Antiprotease-Hypothese beschreibt, dass das relative Gleichgewicht zwischen Proteasen und ihren Inhibitoren die Empfänglichkeit der Lunge bzgl. der Emphysementwicklung bestimmen [52]. Wie bereits dargestellt, kommt es durch Zigarettenrauch und andere Schadstoffe zu einer Aktivierung der Makrophagen und Neutrophilen. Diese Entzündungszellen schütten nun vermehrt Proteasen (MMPs, Cysteinproteinasen, Serinproteinasen) aus und können durch ihre protektiven Antiproteasen nicht vollständig antagonisiert werden. Teilweise kommt es auch zu einem Defizit an Antiproteasen. Das Resultat daraus ist der Abbau von Elastin im Lungenparenchym und folglich die Entstehung eines Emphysems (Abbildung 2.9) [17, 73, 74].

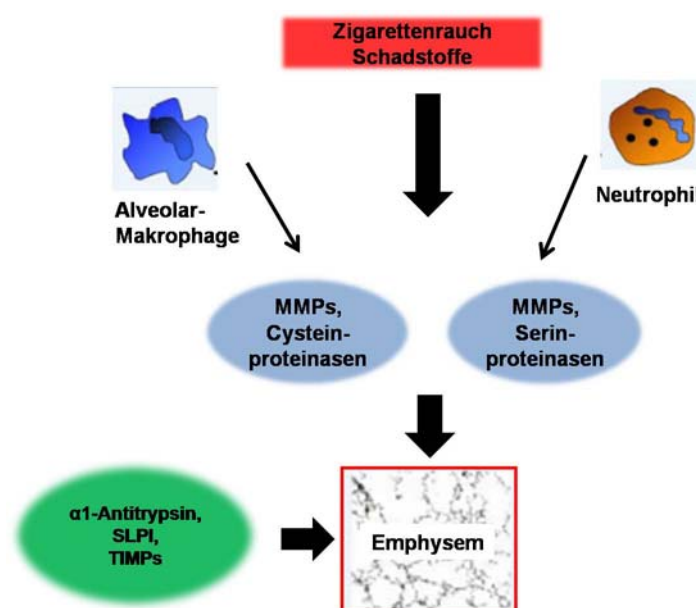


Abbildung 2.9: Protease-Antiprotease-Dysbalance und die Bedeutung in der COPD-Pathogenese

(MMPs = Matrixmetalloproteasen; SLPI = *secretory leukoprotease inhibitor*; TIMPs = *tissue inhibitors of metalloproteinases*; verändert nach Vogelmeier [52])

Zu den sezernierten Serin-Proteasen gehört u.a. die neutrophile Elastase, die normalerweise durch die Antiproteasen α 1-Antitrypsin und SLPI (*secretory leukoprotease inhibitor*) im Lungenparenchym inhibiert wird. α 1-Antitrypsin und SLPI

können durch oxidativen Stress, als auch durch Cathepsine inaktiviert werden [17]. In der BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten konnte eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Elastasen nachgewiesen werden, die mit der Abnahme des FEV₁ korrelierte. Des Weiteren steigert die neutrophile Elastase, neben den anderen Serin-Proteasen Cathepsin G und Proteinase 3, die Mukussekretion aus den Drüsen- und Becherzellen [17, 75].

Zu den Cystein-Proteasen gehören die Cathepsine, die von Makrophagen sezerniert werden [62]. In Bezug auf MMPs konnte gezeigt werden, dass vor allem die Ausschüttung von MMP-1 (Kollagenase), MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-12 (Makrophagenelastase) in die COPD-Pathogenese involviert sein könnte [20]. Eine erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-9 konnte in der BAL von COPD-Patienten gezeigt werden. Des Weiteren war die Aktivität von MMP-9 im Lungenparenchym verstärkt und MMP-12 Knockout-Mäuse entwickelten kein Emphysem nach Rauch-Exposition [52, 76-78]. MMPs werden durch *tissue inhibitors of matrixmetalloproteinase* (TIMPs 1-4) inhibiert [79]. Ein Mangel an TIMP-3 führt zu einem fortschreitenden destruktiven Emphysem und verdeutlicht die Rolle bei der Entwicklung einer COPD [80]. Weiterhin konnte eine Interaktion zwischen neutrophilen Elastasen und MMPs nachgewiesen werden. MMPs können α 1-Antitrypsin inaktivieren und die neutrophile Elastase kann TIMPs abbauen [52].

2.2.5.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht, wenn es zu einem Ungleichgewicht von Oxidantien zu Antioxidantien kommt. Im Normalfall spielen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) eine wichtige Rolle für die Signalübertragung und die Regulation der Transkription. Kommt es zu einem Überschuss an Oxidantien, werden Lipide, Proteine und Nukleinsäuren geschädigt. Dies kann zu einer Destruktion von Zellen führen [81]. Reaktive Sauerstoffspezies belasten die Lunge entweder über exogene Quellen, wie Zigarettenrauch und Luftverschmutzungen oder durch endogene Herkünfte aus Neutrophile, Makrophagen und Epithelzellen [82]. Abbildung 2.10 zeigt die verschiedenen destruktiven Mechanismen von oxidativen Stress in COPD.

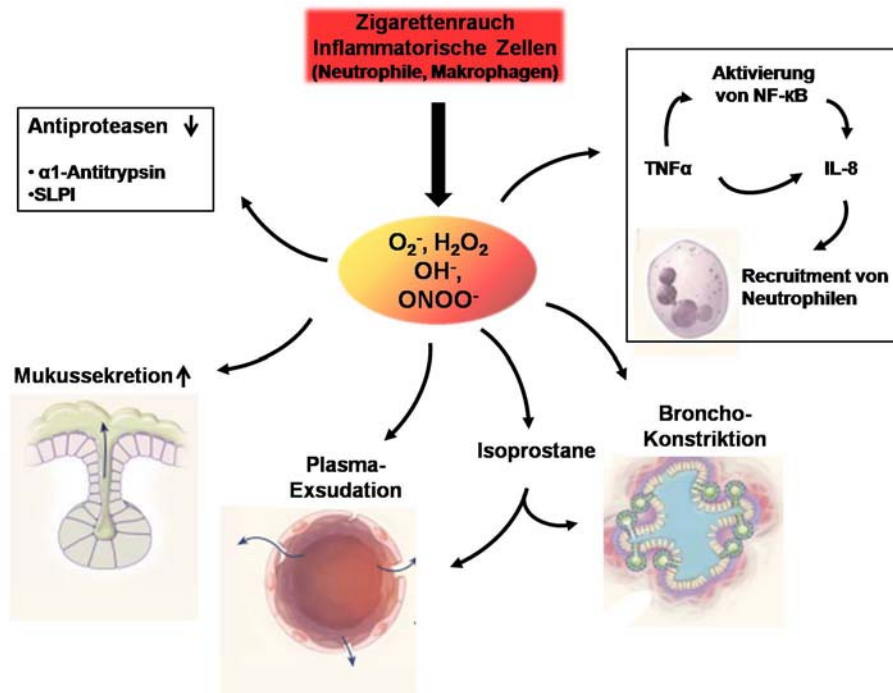


Abbildung 2.10: Reaktive Sauerstoffmetabolite und ihre zerstörenden Effekte in COPD

NF-κB = Nuklear Faktor κB; TNFα = Tumor-Nekrose-Faktor α; IL-8 = Interleukin 8; SLPI = Sekretorischer Leukoprotease-Inhibitor; O_2^- = Superoxid; H_2O_2 = Wasserstoffperoxid; OH^- = Hydroxidion; $ONOO^-$ = Peroxynitrit (modifiziert nach Barnes [16])

ROS kann zu einer oxidativen Funktionsbeeinträchtigung der Anti-Proteasen, wie α1-Antitrypsin und SLPI, führen, was folglich in einem raschen Abbau von Elastin im Lungenparenchym und in einer Inflammation endet [16, 83]. Des Weiteren aktiviert oxidativer Stress die Mukussekretion der Drüsenzellen entweder direkt über EGFR (epidermal growth factor receptor) oder über eine gesteigerte Aktivität der neutrophilen Elastase [17]. Eine Oxidation von Arachidonsäure führt zur Bildung von Isoprostanen, welche Einfluss auf funktionale Effekte, wie Bronchokonstriktion und Plasma-Exudation, haben [84]. Zusätzlich kann oxidativer Stress die Inflammation verstärken, indem der pro-inflammatorische Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor-κB (NF-κB) aktiviert wird, der wiederum inflammatorische Mediatoren reguliert. Dabei werden z.B. Gene für TNF-α, MMP-9, TGF-β (Transforming Growth Factor β), Interleukin-8 und andere inflammatorische Proteine angeschaltet, die eine Immunantwort weiter verstärken [85, 86]. Neben den dargestellten Mechanismen existieren noch eine Reihe von anderen zerstörenden Effekten von

ROS auf die Lunge. Alle involvierten Mechanismen tragen zusammen zur neutrophilen Entzündung, Emphysembildung und Fibrose der kleinen Atemwege bei [87].

2.2.5.4 Apoptose

Derzeit wird einer fehlregulierten Apoptose in der Pathogenese der COPD eine immer höhere Bedeutung zugeteilt. Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet, der zu einer Eliminierung von unerwünschten, beschädigten oder infizierten Zellen führt. Die Apoptose steht unter normalen Umständen im Gleichgewicht mit der Proliferation (Wachstum und Vermehrung von Zellen) und Differenzierung. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellneubildung könnte die Entwicklung von COPD begünstigen [88]. Studien konnten eine erhöhte Apoptose von Endothelzellen, Alveolarepithelzellen, interstitielle Zellen und Entzündungszellen (Neutrophile und Lymphozyten) in Lungen von COPD-Patienten beobachten [89, 90]. In Abbildung 2.11 wird die Interaktion der Apoptose mit anderen pathogenetischen Mechanismen, wie Inflammation, Preotease-Antiprotease-Dysbalance und oxidativer Stress dargestellt.

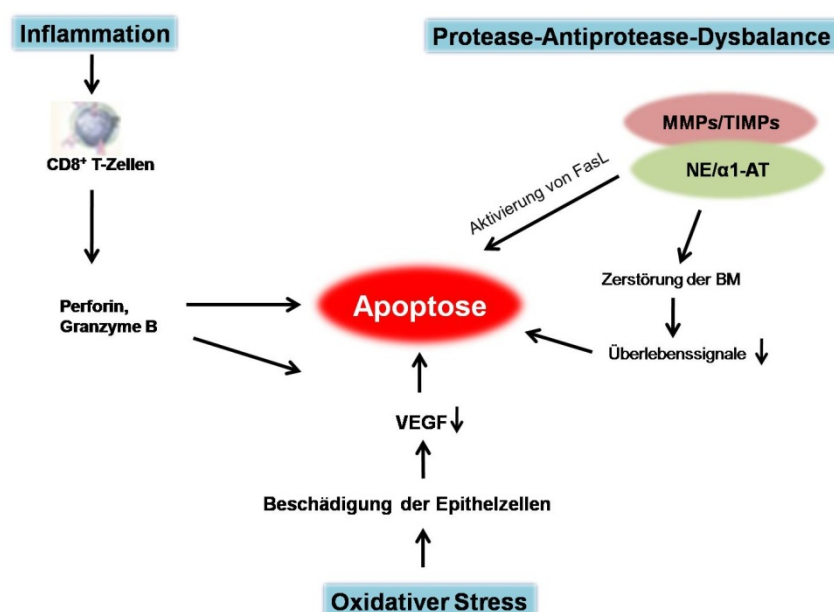


Abbildung 2.11: Interaktion der Apoptose mit pathogenetischen Mechanismen der COPD (verändert nach Demedts [91])

BM: Basalmembran; MMPs: Matrix- Metalloproteinasen; TIMP: *tissue inhibitor of metalloproteinase*; α 1-AT: α 1-Anti-Trypsin; FasL: Fas Ligand; VEGF: Vaskular endothelialer Wachstumsfaktor [91].

Oxidativer Stress ist in der Lage Apoptose in Endothel- und Epithelzellen zu induzieren [92]. Die Apoptose der Alveolarzellen wurde mit einer verminderten Expression des Signalmoleküls VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und dessen Rezeptoren in Verbindung gebracht. Eine Blockade dieser Rezeptoren an einem Rattenmodell führte zur Apoptose der Alveolarzellen resultierend in einem Emphysem [90, 93]. In VEGF Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass es in diesen Mäusen zu einer erhöhten Apoptose von mikrovaskulären Endothelzellen und zu einem Verlust der Kapillaren kommt. Der Verlust an Kapillaren gehört zu den Merkmalen der COPD/Emphysem [94]. Zusätzlich kann eine erhöhte Anzahl an CD8+ T-Lymphocyten aufgrund der aufgetretenen Inflammation zu einer gesteigerten Ausschüttung an Perforin, Granzyme-B und TNF- α führen und so eine Apoptose der Alveolarepithelzellen einleiten [91, 95].

Eine gesteigerte Apoptose in COPD-Patienten wird auch mit einer erhöhten proteolytischen Aktivität verschiedener Enzyme durch die Protease-Antiprotease-Dysbalance assoziiert. Eine Zerstörung der Basalmembran (BM) durch MMPs führt zu einem Verlust an Überlebenssignalen und induziert eine Apoptose von Epithelzellen [91]. Des Weiteren kann eine Apoptose direkt durch eine Proteolyse von Signalen, die den Zelltod einleiten, beeinflusst werden. Es wurde gezeigt, dass der Apoptose-induzierende Tumornekrosefaktor FasL (Fas ligand), ein wichtiger Regulator des Immunsystems, durch MMP-7 aktiviert wird und eine Apoptose der Epithelzellen vermittelt [91, 96].

2.2.6 Derzeitige Behandlungsstrategien von COPD

Bei den derzeitigen Behandlungsstrategien von COPD können lediglich die Symptome gemindert, die Frequenz und die Schwere der Exazerbationen reduziert sowie der Gesundheitszustand als auch die Belastbarkeit verbessert werden. Leider gibt es bis heute keinen Ansatz, der die Progression der COPD-Erkrankung verhindert oder heilen kann. Dennoch kann das Leben mit COPD kurz- oder langfristig mittels therapeutischer Maßnahmen, die jeweils auf den Schweregrad der COPD, die Symptome und die Begleiterkrankungen abgestimmt werden müssen, deutlich erleichtert werden [19, 97]. Eine Therapie der COPD-Patienten setzt sich deshalb aus individuellen Bausteinen zusammen:

- Rauchentwöhnung als primär wichtigste Instanz zur Eindämmung des Fortschreitens der Erkrankung; kann zu einer symptomatischen Besserung führen [19, 98, 99];
- Pharmakologische Therapie zur Erhöhung der FEV₁ oder Verbesserung anderer Variablen der Lungenfunktion:
 - Bronchodilatoren [19]:

- β 2-Agonisten → relaxieren die Atemwegsmuskulatur durch eine Stimulierung der β 2-adrenergen-Rezeptoren resultierend in einer erhöhten cAMP-Produktion und der damit verbundenen Hemmung einer Konstriktion der Bronchien (z.B. Salbutamol, Fenoterol, Salmeterol, Formoterol, Indacaterol) [100-103];
- Anticholinergika → blockieren den Acetylcholineffekt an den muskarinen Rezeptoren und führen so zu einer Dilatation der Bronchien und vermindern die Schleimsekretion (z.B. Ipratropiumbromid oder Tiotropiumbromid) [19, 104, 105];
- Corticosteroide: Häufig zur Anwendung bei schweren und sehr schweren Stadien der COPD ($FEV_1 < 60 \%$), haben viele Nebenwirkungen [19, 106];
- Phosphodiesterase-4 Inhibitor zur Anreicherung an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch die Synthese von Entzündungsmediatoren und chemotaktischen Substanzen reduziert wird (z.B. Roflumilast) [19, 97];
- Jährliche Influenza- und eine Pneumokokkenschutzimpfung, zur Verringerung von Exazerbationen - ausgelöst durch Bakterien und Viren - und zur Reduzierung der dadurch folgenden Mortalität [107, 108];
- Pulmonale Rehabilitation zur Verbesserung der Symptome, der körperlichen Leistungsfähigkeit, und der systemischen Probleme (z.B. Depressionen, soziale Isolierung, Verlust an Muskelmasse und Gewicht) [19, 109, 110];
- Sauerstoff-Therapie und ventilatorische Unterstützung zur Erhöhung der Überlebensdauer, jedoch nicht der Lebensqualität [19, 111, 112];
- Operative Therapie:
 - operative Lungenvolumenreduktion (LVR) → Resektion von stark emphysematös veränderten Lungenarealen der oberen Lungenlappen [113, 114];
 - Bronchoskopische Lungenvolumenreduktion (BLVR) mittels Ventilverfahren, Vaporisierung des Lungengewebes, Hydrogelinstillation, implantierbare Drahtspiralen oder Atemwegsbypass [115];
 - Lungentransplantation der kompletten Lunge (BLT: *bilateral lung transplantation*) oder einer Hälfte (SLT = *single lung transplantation*) zur Verbesserung der Lebensqualität und der Belastbarkeit, jedoch nicht der statistischen Lebenserwartung (mittlere 3-Jahres-Überlebensrate = 60 %).

Limitiert durch niedrige Anzahl an passenden Spender-Organen und hohen Kosten [19, 116, 117];

- Bullektomie zur Komprimierung des benachbarten Gewebes großer blasiger Veränderungen der Lunge ($< 1/3$ eines Lungenflügels, Bullae wird entfernt) [118].

2.3 Serotonin (5-HT)

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit die Untersuchung der Rolle des serotonergen Systems in COPD/Emphysem war, wird im folgenden Teil die Funktion von Serotonin näher beschrieben. Serotonin (5-HT) ist einer der am längsten bekannten Neurotransmitter [119]. Woolley konnte im Jahre 1962 beweisen, dass 5-HT eine wichtige chemische Komponente des zentralen Nervensystems (ZNS) und an der Entwicklung des Gehirns, Funktion und psychischen Erkrankungen beteiligt ist [120, 121]. Der Name Serotonin wurde aus der im Serum enthaltenen Komponente, die den Tonus der Gefäßsysteme reguliert, hergeleitet.

Serotonin wird aus der Aminosäure L-Tryptophan zunächst zu L-5-Hydroxytryptophan hydroxyliert. Dieser Schritt wird durch das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TPH) katalysiert [122]. Derzeit sind zwei TPH-Enzyme bekannt, TPH1 und TPH2, die zwei unabhängige 5-HT-Systeme definieren. TPH1 generiert 95 % des 5-HT in den enterochromaffinen Zellen des Darms, wo es dann über die Blutplättchen zu allen Organen außer zum Gehirn transportiert wird. Da 5-HT nicht die Blut-Hirn-Schranke durchqueren kann, wird es im zentralen Nervensystem (ZNS) durch TPH2 hydroxyliert [123-126]. Danach erfolgt eine Decarboxylierung von 5-Hydroxy-L-Tryptophan (5-HTP) zu 5-HT durch das Enzym aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase [122]. Die Synthese von Serotonin ist in Abbildung 2.12 dargestellt.

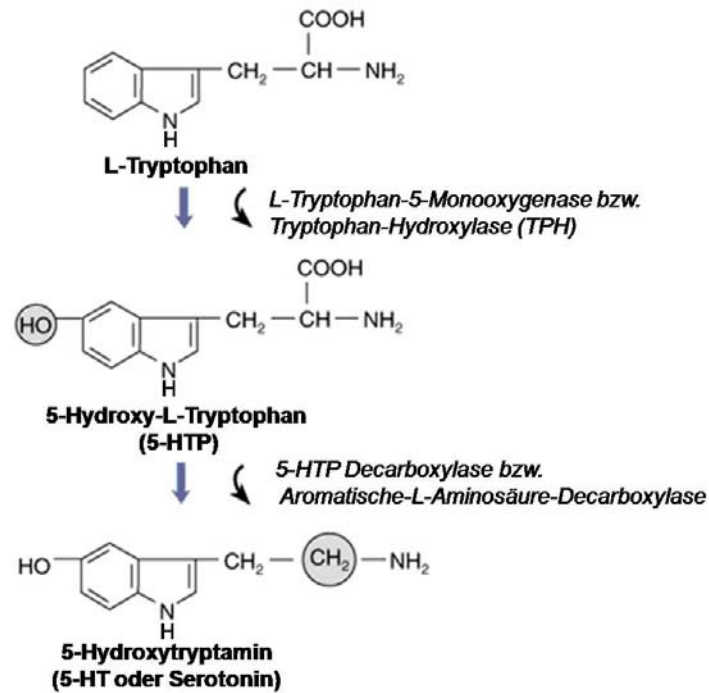


Abbildung 2.12: Synthese von Serotonin

(Quelle: homepage.psy.utexas.edu [127], modifiziert)

Im Nervensystem wird Serotonin im neuronalen Zytoplasma der synaptischen Vesikel durch Monoamin-Transporter aufgenommen und gespeichert. Durch einen Ca^{2+} -abhängigen Prozess wird 5-HT aus den synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt. Über membrangebundene, auf Axonen, Soma und Dendriten lokalisierte Serotonintransporter (SERT, 5-HTT) kann 5-HT wieder in das Neuron resorbiert werden. Des Weiteren kann 5-HT über Serotoninrezeptoren weitere Signalkaskaden in der Postsynapse auslösen. Katabolisiert wird freies Serotonin von der mitochondrialen Monoaminoxidase Typ A (MAO) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA, Abbildung 2.13) [128, 129]. Neben der Speicherung und Ausschüttung von Serotonin in der Präsynapse, wird es nicht-neuronal zu 95 % in den enterochromaffinen Zellen gespeichert und in den Darm ausgeschüttet [130].

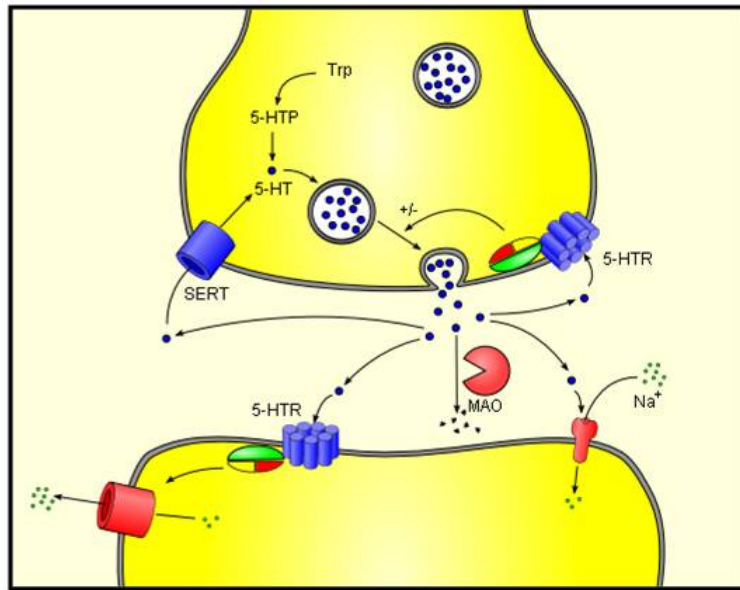


Abbildung 2.13: Biochemie des Serotonins (5-HT) am Beispiel des synaptischen Spalts zwischen zwei Neuronen

Abkürzungen: Tryptophan (Trp), 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), Serotoninrezeptoren (5-HTR), Serotonintransporter (SERT), Monoaminooxidase (MAO) (Quelle: wikimedia common [131], produziert von Sven Jähnichen)

Serotonin tritt als Gewebshormon, bzw. Neurotransmitter im ZNS, Darm, Herz-Kreislaufsystem und im Blut auf, wo es in viele Prozesse involviert ist. Derzeit wird Serotonin mit vielen neurologischen Erkrankungen wie z.B. Depression, Angst, soziale Phobie, Schizophrenie, Zwangsstörungen, Panikstörungen, Migräne [119, 122, 132, 133] und anderen Effekten außerhalb des ZNS (Abbildung 2.14) in Verbindung gebracht [134].

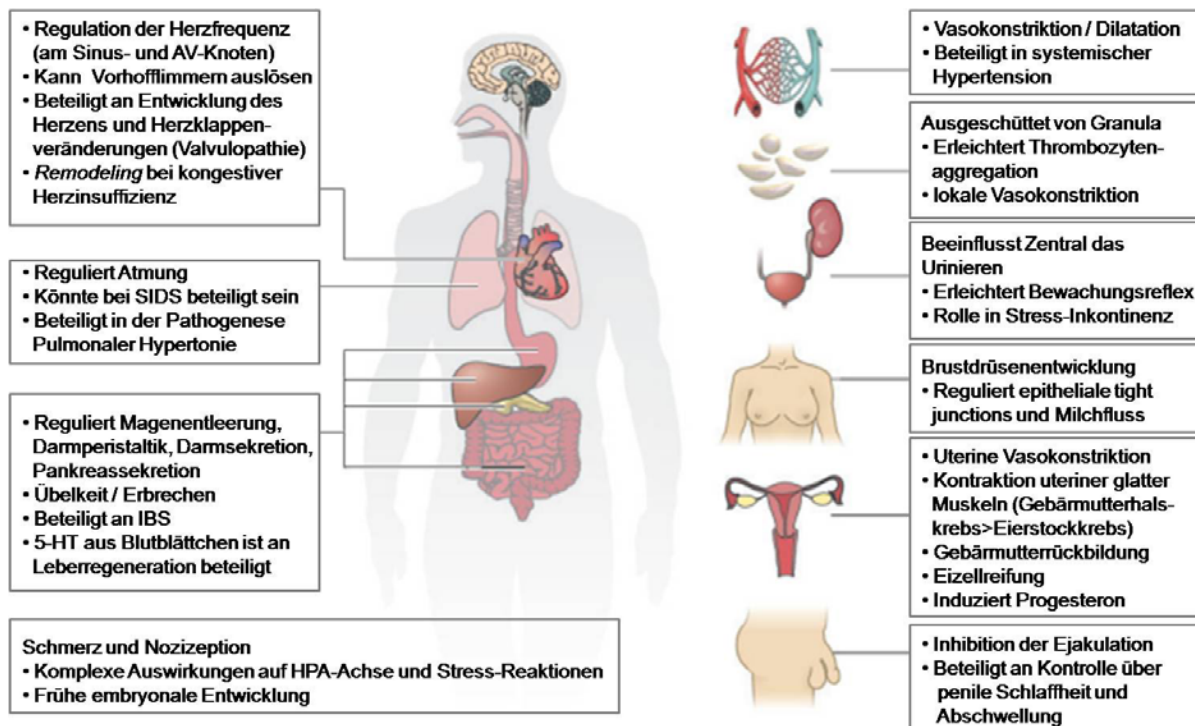


Abbildung 2.14: Einfluß von Serotonin außerhalb des Zentralen Nervensystems

5-HT: Serotonin; AV: atrioventrikular; HPA: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren; IBS: Reizdarmsyndrom; SIDS: plötzlicher Kindstod (modifiziert nach Berger *et al.* 2009 [134])

Serotonin beeinflusst die erwähnten Effekte auf den menschlichen Organismus durch Signaltransduktion-Kaskaden in Abhängigkeit von verschiedenen Serotoninrezeptortypen, die im ZNS, peripheren Gewebe oder auf Thrombozyten exprimiert werden (präsynaptisch, postsynaptisch, glattmuskulär, endothelial, und/oder im Herzgewebe). Die IUPHAR (*The International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) hat auf der Basis 1) struktureller (Aminosäuresequenz und Genlokalisierung), 2) signalübertragender und 3) pharmakologischer (ligandenbezogene Eigenschaften) Kriterien, die Rezeptoren 7 unterschiedlichen Rezeptorfamilien (5-HT₁ bis 5-HT₇) mit verschiedenen Subtypen klassifiziert [119, 135].

Tabelle 2.2: 5-HT-Rezeptor-Familien

(IP3: Inositoltriphosphat; DAG: Diacylglycerol; cAMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat; SIDS: plötzlicher Kindstod; IBS: Reizdarmsyndrom.

Modifiziert nach Berger *et al.* 2009 [134])

Familie	Potential	Typ	Wirkmechanismus
5-HTR₁	inhibierend	G _i /G ₀ -Protein gekoppelt	Verringert intrazelluläre Konzentration an cAMP
	<u>Beispiele:</u> <ul style="list-style-type: none"> 5-HTR_{1A}: Stimmungslage [136]; Appetitsteigerung [137]; SIDS (weniger 5-HTR_{1A}) [138]; Urogenitale Funktion 5-HTR_{1B}: Herz-Kreislaufsystem [139]; Stimmungslage [136]; Appetitsenkung [137]; Urogenitale Funktion [140] 		
Familie	Potential	Typ	Wirkmechanismus
5-HTR₂	exzitatorisch	G _{q11} -Protein gekoppelt	Erhöht intrazelluläre Konzentration an IP3, DAG und Ca ²⁺
	<u>Beispiele:</u> <ul style="list-style-type: none"> 5-HTR_{2A}: Herz-Kreislaufsystem [139]; Blutgerinnung ; Wirkung von LSD [141]; Herzfunktion [142]; Leberregeneration [143] 5-HTR_{2B}: Herz-Kreislaufsystem [139]; Herzfunktion [144, 145]; Pulmonale arterielle Hypertonie (5-HTR_{2B}) [146]; Leberregeneration [143] 5-HTR_{2C}: Appetitsenkung [137]; Urogenitale Funktion [140] 		
Familie	Potential	Typ	Wirkmechanismus
5-HTR₃	exzitatorisch	Liganden-gesteuerter Na ⁺ /K ⁺ -Ionen-Kanal	Depolarisiert Zellplasmamembran
	<u>Beispiele:</u> Magen-Darm-System [147, 148]; Herzfunktion [142]; IBS [149]		
Familie	Potential	Typ	Wirkmechanismus
5-HTR₄	exzitatorisch	G _s -Protein gekoppelt	Erhöht intrazelluläre Konzentration an cAMP
	<u>Beispiele:</u> Magen-Darm-System [147, 148]; Herzfunktion [150, 151]; IBS [149]		
Familie	Potential	Typ	Wirkmechanismus
5-HTR₅	inhibierend	G _i /G ₀ -Protein gekoppelt	Verringert intrazelluläre Konzentration an cAMP
	<u>Beispiele:</u> 5-HTR_{5A} nur in Menschen, wenig bekannt, Spekulation über Motorsteuerung, Angst, Depression, Lernen, Gedächtnis-Konsolidierung, adaptives Verhalten und Entwicklung des Gehirns [152]		
Familie	Potential	Typ	Wirkmechanismus
5-HTR₆	exzitatorisch	G _s -Protein gekoppelt	Erhöht intrazelluläre Konzentration an cAMP
	<u>Beispiele:</u> Bedeutung noch unklar, Spekulation über Rolle bei psychischen Störungen [153]		
Familie	Potential	Typ	Wirkmechanismus
5-HTR₇	exzitatorisch	G _s -Protein gekoppelt	Erhöht intrazelluläre Konzentration an cAMP
	<u>Beispiele:</u> Herz-Kreislaufsystem [139]; Thermoregulation [154]		

Wie aus Tabelle 2.2 zu entnehmen ist, werden alle Signale der 5-HT-Rezeptoren über GTP-Proteine (G-Proteine) weitergeleitet. Eine Ausnahme stellt der liganden-gesteuerte Na^+/K^+ -Ionen-Kanal 5-HTR₃ dar. G-Proteine sind Trimere bestehend aus einer α , β und γ Untereinheit und binden an die intrazelluläre Domäne des gekoppelten Rezeptors. Nach der Bindung von einem Liganden (z.B. Serotonin) ändert sich die Rezeptor-Konformation und bewirkt eine Aktivierung des G-Proteins. Das im inaktivierten Zustand an die α -Untereinheit gebundene GDP wird zu GTP phosphoryliert. Das trimere G-Protein wird instabil, abgespalten und zerfällt in die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit. Das nun aktivierte G-Protein kann die von Liganden übertragenen Signale in das Zellinnere weiterleiten (Signaltransduktion). Die α -Untereinheit des G-Proteins besitzt eine GTPase-Aktivität und dephosphoryliert das gebundene GTP in $\text{GDP} + \text{Pi}$. Die α -Untereinheit des G-Proteins kann somit wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit reassoziieren, erneut an einen Rezeptor binden und liegt wieder inaktiviert vor.

G-Proteine werden aufgrund ihrer Wirkung und Funktion in G-Protein-Subfamilien eingeteilt. Die Weiterleitung der Signale erfolgt in Abhängigkeit der Subfamilie und bezieht weitere Botenstoffe mit ein [65].

Die Serotoninrezeptoren 5-HT₁ und 5-HT₅ sind G_{i/o}-gekoppelte Rezeptoren (i = inhibitorisch; o = olfaktorisch) [134]. Bei Aktivierung des G-Proteins wird die intrazelluläre cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-Konzentration verringert. Dies kann einerseits über die Inhibition der Adenylatcyclase erfolgen, andererseits über die Stimulation der Phosphodiesterase, die cAMP zu AMP hydrolysiert.

Serotoninrezeptoren der Familie 2 (5-HTR₂) sind an G_q-Proteine (aktivieren Phospholipase C- β) gekoppelt [134]. Eine Aktivierung dieser G-Proteine führt zu einer Stimulation der Phospholipase C (PLC) in der Zellmembran. Durch PLC wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die *second messenger* Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gespalten. IP₃ diffundiert sehr schnell durch das Cytosol und bindet bei Erreichen des endoplasmatischen Retikulums (ER) an seinen Liganden-aktivierten Calciumkanal. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird durch die Freisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern des ERs erhöht [65]. DAG aktiviert die Calcium-abhängige Proteinkinase C (PKC), was wiederum die Phosphorylierung von Membrankanälen und anderen Proteinen bewirkt. Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels kann wiederum zu einer Aktivierung der PKC führen. Des Weiteren steuert ein Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} eine Aktivierung Ca^{2+} -sensibler Kanäle (*Ca^{2+} -release-activated channels*, CRAC) und führt damit zu einem weiteren Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels durch Einstromen extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen [65]. Eine G_q-Protein-gekoppelte Erhöhung von Ca^{2+} spielt zum Beispiel eine wichtige Rolle

bei der Kontraktion der glatten Muskelzellen vieler Hohlgorgane (Ausnahme Herz), Blut- und Lymphgefäße. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass Serotonin zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen führt, welcher über eine 5-HT_{1B/D}, 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B} Signalweg vermittelt wird [155, 156].

Die Serotoninrezeptoren der Familie 4, 6 und 7 (5-HT₄, 5-HT₆ und 5-HT₇) sind an G_s-Proteine (s = stimulatorisch) gekoppelt [134], die bei Aktivierung Ca²⁺-unabhängige Adenylatcyclasen stimulieren. Unter Einfluss von ATP entsteht cAMP und aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die verschiedene metabolische Inhibitoren, Membranproteine oder Genexpressionsfaktoren (z.B. CREB) phosphorylieren kann [65].

Neben den Serotonin-Rezeptoren gibt es noch die Serotonin-Transporter (5-HTT oder SERT). 5-HTT ist ein Protein der Zellmembran und gehört zu der Neurotransmitter-Natrium-Symporter Familie (Na⁺/Cl⁻-abhängige Transporter). Im ZNS ist er für den Transport von Serotonin aus dem Extrazellularraum in den Intrazellularraum verantwortlich, wodurch er die Serotoninwirkung im synaptischen Spalt beendet. Des Weiteren ist 5-HTT in anderen Geweben, wie z.B. in der Plazenta, im peripheren Nervensystem, im Epithel, in enterochromaffinen Zellen, in Thrombozyten und in der Lunge exprimiert. Die Translokation von Serotonin durch den Transporter erfolgt mit einem Na⁺-Ion und einem Cl⁻-Ion, während der Antiport mit einem K⁺-Ion und eventuell einem H⁺-Ion stattfindet [157, 158].

Serotonin kann neben vasoaktiven Effekten auch mitogene Einflüsse auf Zellen haben. Der Signalweg konnte bisher jedoch noch nicht genau aufgeklärt werden. Dabei könnte eine Bindung von Serotonin an die 5-HT Rezeptoren (5-HT_{1B/D}, 5-HT_{2A}, und 5-HT_{2B}) im Zusammenspiel mit einem Einschleusen von Serotonin durch den 5-HTT eine wichtige Rolle zukommen [146, 159-161]. Serotonin führt dabei zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*), die über Phosphorylierungs-Kaskaden gesteuert werden und wichtige Komponenten des Signalweges zur Steuerung der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation und Zelltod sind [162]. Es gibt verschiedene Arten der MAPK mit unterschiedlichen Kaskaden. So gehört ERK (*extracellular signal-related kinases*) zu den MAPK und führt unter anderem zur Zellproliferation [163]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Serotonin über die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) eine Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen vermittelt [164]. JNK wird über Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie EGF, PDGF, TGF- β und TNF, sowie zellulärem Stress aktiviert, was Zell-Antworten wie Entzündung, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung zur Folge haben kann

[162, 164]. Es wurde zusätzlich beschrieben, dass eine Inhibition des 5-HTT den mitogenen Effekt von Serotonin an glatten Muskelzellen hemmt [165, 166].

2.3.1 Der Einfluss von Zigarettenrauch auf das serotonerge System in COPD und anderen Lungenerkrankungen

Viele Studien deuten darauf hin, dass das serotonerge System eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COPD spielt. Raucher mit chronischem Husten haben z.B. eine erhöhte Serotonin-Stoffwechselprodukt-Ausscheidung im Urin [167] und einen erhöhten Serotonin-Gehalt in Thrombozyten [168-170].

Das im Zigarettenrauch enthaltene Nikotin erhöht die Ausscheidung von Serotonin im Gehirn. Im Gehirn heften sich die Nikotinmoleküle an die prä- und postsynaptisch lokalisierten Nikotin-Rezeptoren der Nervenzellen [171-173] und führen so zu einer Ausschüttung unterschiedlicher Neurotransmitter, wie Dopamin, Serotonin, Noradrenalin und Endorphinen [174]. Aufgrund des Einflusses von Nikotin auf Serotonin, könnte eine Dysfunktion des Serotonin-Signalweges ein wichtiger Faktor für eine Entwicklung von COPD sein.

Es ist bekannt, dass eine reduzierte Aktivität der MAO-A und MAO-B (Monoaminoxidase Typ A bzw. B) im peripheren Gewebe, Lungen, Nieren und anderen Organen von Rauchern besteht [175]. MAO ist ein Enzym, welches 5-HT zu 5-HIAA abbaut. Diese Katalyse von 5-HT durch MAO wird durch eine Generierung von ROS begleitet und ist an der Proliferation von glatten Muskelzellen, Hypoxie, Atemnot und Krebswachstum beteiligt [176, 177]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Serotonin hauptsächlich in Thrombozyten enthalten ist und Zigarettenrauch zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen kann, was eine erhöhte Ausschüttung von Serotonin zur Folge hat [178]. Eine Kombination aus einer erhöhten Serotonin Ausschüttung durch Thrombozyten und einer reduzierten MAO-Aktivität können zu einer erhöhten Serotoninkonzentration im Plasma führen und so eine gesteigerte Aktivierung von vaskulären Rezeptoren in der Lunge resultierend in einer Steigerung des Blutdruckes bewirken [179]. Zusätzlich induziert Serotonin die Proliferation von glatten Muskelzellen [180] und trägt zu Entzündungen und zu Thrombose von Gefäßen bei [181].

Weitere Studien zeigten, dass der im Tabakblatt enthaltene bzw. künstlich zugesetzte Zucker beim Rauchen verbrennt und so Acetaldehyd entsteht. Acetaldehyd wirkt reduzierend auf das Enzym MAO-B (Monoaminoxidase B), das im Gehirn normalerweise die Neurotransmitter Dopamin und Serotonin abbaut. Eine Folge daraus ist in diesem Falle ein erhöhter Serotonin-Spiegel im Gehirn [182].

Des Weiteren wird eine Fehlregulation des zirkulierenden Serotonins in COPD-Patienten mit dem Serotonin-Transporter in Verbindung gebracht. Dieser kontrolliert den Transport von Serotonin zwischen der Zelle und dem Blut und leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Regulation des Serotonin-Spiegels im Plasma [183]. Wie schon beschrieben, führt Nikotin zu einer Aktivierung der Thrombozyten und stimuliert die Ausschüttung von 5-HT in das Plasma [184]. Serotonin kann nun durch den Serotonin-Transporter wieder in die Thrombozyten aufgenommen werden, was eine intrazelluläre Erhöhung an 5-HT zur Folge hat. Diese erhöhte Konzentration kann durch eine Feedback-Antwort zu einer Modifizierung des Serotonin-Transporters führen und die Aufnahme von Serotonin in die Thrombozyten verringern. Eine Inhibition der 5-HT Wiederaufnahme kann somit zu einer Erhöhung der 5-HT Konzentration im Plasma von COPD-Patienten führen [185, 186].

Oft wird die Entwicklung einer PH im Zusammenhang mit COPD auf eine alveoläre Hypoxie zurückgeführt, welche zu einer pulmonalen Vasokonstriktion, einem Gefäßumbau (*Remodeling*) und zu einem erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand führt [60, 187]. Untersuchungen zeigten, dass 5-HTT auch an der pulmonal vaskulären Hyperplasie und dem Umbau (*Remodeling*) der pulmonalen Gefäße bei Hypoxie-induzierter PH in Mäusen [188] und an der humanen PH beteiligt ist [189]. Durch den 5-HTT werden unter anderem Proliferationsprozesse der glatten Muskelzellen in Lungenarterien reguliert. In 5-HTT Knock-out Mäusen konnte keine Entwicklung einer PH oder ein Gefäßumbau unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden [188]. Eine Überexpression des 5-HTT in Mäusen führte hingegen zu einer schnellen Hyperplasie der glatten Muskelzellen mit einer folgenden Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie [189, 190].

In Patienten mit COPD scheint ein 5-HTT Gen-Polymorphismus den Schweregrad einer hypoxämischen PH zu bestimmen. Hierfür verantwortlich wird besonders der 5-HTT LL-Genotyp gemacht, der zu einer erhöhten 5-HTT-Expression in Lungenarterie glatten Muskelzellen führt. COPD-Patienten mit LL-Genotyp entwickeln eine schwere PH im Vergleich zu den Patienten mit dem LS oder SS Genotyp [191]. Bestätigt werden konnte diese Annahme durch eine teilweise erhöhte Expression der 5-HTT L-Variante (*long allelic variant*) in COPD-Patienten [187].

Lerman *et al.* veröffentlichte hingegen eine Studie, in der er die Rolle des 5-HTT in Rauch-induzierten Erkrankungen ausschließt [192].

Des Weiteren wurde beschrieben, dass Serotonin eine pulmonale Gefäßkontraktion durch die Aktivierung von 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} steuert [119, 193]. Eine Veränderung (Polymorphismus) des 5-HTR_{2A} wurde mit arterieller PH (PAH), Herzinfarkt und psychischen

Beschwerden in Verbindung gebracht [187, 194, 195]. In Rauchern konnte eine erhöhte 5-HT_{2A} Rezeptor-Dichte in Thrombozyten in Abhängigkeit des Konsums von Zigaretten am Tag nachgewiesen werden [170].

In passiv gerauchten Ratten wurde zudem eine erhöhte Expression von 5-HTR_{2A} in bronchalen glatten Muskelzellen festgestellt. Durch eine Bindung von Serotonin an diesen Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung des G-Protein gekoppelten Raf/ERK1/2 Signalweges, welcher eine bronchiale Hyperreaktivität auslöst [196]. In pulmonaler Fibrose und PAH konnte eine erhöhte Expression von 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} nachgewiesen werden. Eine Blockade dieser beiden Rezeptoren mit verschiedenen Komponenten konnte eine Entwicklung dieser Lungenerkrankungen in Mäusen rückgängig machen [146, 197].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Zigarettenrauch das serotonerge System beeinflusst. Der genaue Mechanismus konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und beinhaltet teilweise kontroverse Annahmen. Dennoch wird deutlich, dass ein gestörter regulatorischer Prozess von Serotonin in Bezug auf die Aufnahme, Speicherung, Ausschüttung, Wiederaufnahme oder Spaltung durch MAO zu einer erhöhten Konzentration im Plasma und in den Blutgefäßen der Lunge führt und in die Pathogenese von COPD involviert sein könnte [186, 198, 199].

2.4 Der Serotonin-Rezeptor-Antagonist Tergurid

Tergurid (S(+)-N,N-Diethyl-N'([8 α]-6Methylergolin-8-YL)urea; Summenformel: C₂₀H₂₈N₄O) ist ein partial synthetisches 8 α -Aminoergolin, welches hohe Bindungsaffinität an dopaminerge, serotonerge und α -adrenerge Monoaminrezeptoren besitzt [200-202].

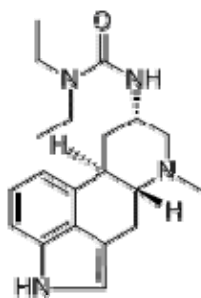


Abbildung 2.15: Strukturformel von Tergurid

(Quelle: www.chemicalbook.com [203])

Tergurid ist ein nicht-kompetitiver Serotonin-Rezeptor-Antagonist. Tergurid hemmt die agonistische Wirkung von Serotonin auf den 5-HT_{2A}-Rezeptor, den 5-HT_{2B}-Rezeptor und den 5-HT₇ [204]. Die anti-serotonerge Eigenschaft von Tergurid auf diese Rezeptoren konnte in

Blutgefäßen, Thrombozyten und interstitiellen valvulären Zellen gezeigt werden [163]. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass Tergurid eine Entwicklung der pulmonalen Hypertonie und der idiopathischen pulmonalen Fibrose in Tiermodellen verhindert [197, 205] und somit anti-proliferatorische und anti-fibrotische Eigenschaften besitzt, die einen *reverse-Remodeling* Prozess antreiben könnten. Es gibt jedoch eine Diskrepanz zwischen den Effekten von Tergurid auf den 5-HT_{2A}-Rezeptor *in vitro* und *in vivo*. In 5-HT_{2A} – überexprimierenden Zellen konnten partial agonistische Effekte von Tergurid beobachtet werden. In Gewebemodellen wurden hingegen nur rein antagonistische Effekte auf den 5-HT_{2A}-Rezeptor beschrieben. Vermutlich stehen die abweichenden Effekte in den Zellsystemen mit der Überexpression von dem 5-HT_{2A}-Rezeptor im Zusammenhang, was zu einer anomalen Kopplung von Rezeptor und G-Protein führt [200, 204].

Darüber hinaus wirkt Tergurid partial agonistisch auf Dopamin D₂-Rezeptoren in der Hypophyse. Dies führt zu einer gesteigerten Ausschüttung von Dopamin, welches in der Hypophyse die Freisetzung von Prolaktin hemmt und senkt folglich den Prolaktinspiegel im Blut [204, 206, 207]. In Japan wurde Tergurid (Teluron ®) zur Behandlung von Hyperprolaktinämie und von Hypophysenadenomen zugelassen [208, 209]. Die agonistische Wirkung von Tergurid auf Dopamin D₂-Rezeptoren, deren Aktivierung im Zentralnervensystem zu Euphorie, Empfindung von Lust oder Freude führt [210], wurde zusätzlich in neurologischen Erkrankungen (wie z.B. Parkinson, Fibromyalgie, Restless-Legs-Syndrom) getestet [209, 211-213], bei denen eine Störung bei der Bildung des Neurotransmitter Dopamin vermutet wird. Aus klinischen Studien mit Tergurid sind nur wenige Nebenwirkungen bekannt. Tergurid verursachte keine Organschäden, da alle Effekte nach dem Absetzen der Substanz reversibel sind. Die meisten Nebenwirkungen wurden als Effekte des dopaminergen Systems beschrieben, wobei leichte Übelkeit, Erbrechen und Schwindel beobachtet wurden, welche durch eine Tachyphylaxie (Mechanismus der schnellen Toleranzentwicklung) erklärt werden könnte. Im geringen Umfang traten psychische Nebenwirkungen von meist geringer Intensität auf, die gleichfalls reversibel waren [209, 214, 215].

Die Firma Ergonex Pharma (Appenzell, Schweiz) hatte bis 2010 die Rechte zur Entwicklung und Vermarktung von Tergurid weltweit mit der Ausnahme von Japan. 2010 kaufte die Firma Pfizer der Firma Ergonex alle Rechte über Tergurid ab [216]. Früher wurde Tergurid in der tschechischen Republik unter dem Handelsnamen Mysulfon vermarktet, jedoch aus kommerziellen Gründen nicht fortgeführt.

2.5 Ziel der Arbeit

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) hat derzeit eine hohe Inzidenz und ist neben anderen Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Der genaue Mechanismus der zur COPD führt, konnte bisher noch nicht aufgeschlüsselt werden. Eine Erkrankung an COPD ist bis heute nicht heilbar. Es können nur einzelne Symptome der COPD gelindert werden. Die Erforschung der pathogenetischen Mechanismen der COPD könnte daher helfen, neue, nicht nur Symptom-lindernde Behandlungsstrategien bei COPD zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die therapeutische Wirkung des nicht-kompetitiven Serotonin-Rezeptor-Antagonisten Tergurid auf die Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems und der pulmonalen Hypertonie an Mäusen untersucht werden.

Tergurid ist ein Inhibitor der Serotonin-Rezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B} und ein Dopamin D₂-Rezeptor-Agonist. Zur Induktion eines Lungenemphysems an Mäusen wurde ein etabliertes Rauchexpositionmodell verwendet. Die Mäuse wurden 6 Stunden am Tag, 5 Tage pro Woche für 8 Monate einer Zigarettenrauch-Exposition ausgesetzt. Um den präventiven Effekt von Tergurid zu untersuchen, erfolgte eine zweimal tägliche Medikation der Mäuse jeweils vor und nach Rauch-Exposition.

Im Verlauf der Arbeit standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Wie sieht das Expressionsprofil der Serotoninrezeptoren (5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B}) und des Serotonintransporters in Patienten mit COPD und in Rauch-exponierten Mäusen aus?
2. Kann eine präventive Behandlung mit Tergurid vor einer Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems und der pulmonalen Hypertonie schützen?
3. Welchen Einfluss hat Tergurid auf die Serotonin-Konzentration im Plasma von Rauch-exponierten Mäusen?
4. Welche Signalwege werden durch Tergurid beeinflusst?
5. Welche mitogenen Funktionen werden durch Serotonin und Tergurid beeinflusst, die bei der Pathophysiologie des vaskulären *Remodeling* im Rauchmodell eine Rolle spielen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 3.1: Geräte/Materialien/Software für Rauchexposition der Mäuse

Gerät/Material/Software	Firma
3R4F <i>Research</i> Zigaretten	Lexington, Kentucky, USA
Millipore Filter	Millipore, Schwalbach
Pumpe zum Rauchabtransport aus der Kammer	TSE Systems, Bad Homburg
Rauchexpositionssystem	Firma Burghart, Tabaktechnik, Wedel, Deutschland
Vakuum-Pumpen	Jun-Air, Ahrensburg

Tabelle 3.2: Injektionslösungen und Substanzen für physiologische Untersuchungen

Injektionslösung/Substanz	Synonym/Bemerkung	Firma
1 mol/l Salzsäure	1 N HCl	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
50 %ige 2-Propanol / 1 %ige Providonjod-Lösung	Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einbettmedium	Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Ethanol 70 %ig, 96 %ig, 99,6 %ig	vergällt mit Ethylmethylketon	Fischer Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd – Lösung 3,5 – 3,7 %		Otto Fischer GmbH & Co.KG Saarbrücken, Deutschland
Heparin	Heparin-Natrium-25000- ratiopharm®	Ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ketamin 10 %®	Belapharm GmbH & Co KG Vechta, Deutschland
Lidocainhydrochlorid	Xylocain®	Astra Zeneca Wedel, Deutschland
Natriumchloridlösung (100 ml)	Isotonische Natriumchlorid- Lösung Diaco®	Serag-Wiessner KG Naila, Deutschland
Natriumchloridlösung (1000 ml)	zum Spülen und Befeuchten	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Tergurid		Firma Ergonex Pharma GmbH Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Rompun 2 %®	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien für physiologische Untersuchungen

Verbrauchsmaterial	Synonym/Bermerkung	Firma
Dreiwegehahn	Discofix®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einbettkassetten, groß	Rotilabo® Einbettkassette Macro	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassetten, klein	Tissue Tek® 3 Uni-Cassette®	Sakura Finetek Europe B.V Zoeterwoude, Niederlande
Einmalhandschuhe	Vasco® Nitril white	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe	Peha soft® nitrile	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Einmalspritze 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Inject Luer®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalspritze 50 ml	Original Perfusor® Spritze	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Hämatokritkapillaren		Hirschmann Laborgeräte GmbH & CoKG Eberstadt, Deutschland
Hämatokritversiegelungskit		Brand GmbH & CoKG Wertheim, Deutschland
Haushaltsbindfaden Nr.12		
Kanülen 24 G (0,55 mm x 25 mm) 26 G (0,9 mm x 25 mm) 30 G (0,3 mm x 25 mm)	BD Microlance 3®	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
Medizinisches Klebeband	Durapore®	3M, St. Paul, MN, USA
Mulltupfer (20 x 20 cm)		Beese Barbüttel, Deutschland
Parafilm		American National Can Menasha, Wisconsin, USA
Perfusor-Leitung (150 cm)		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
PET-Schläuche	mit unterschiedlichen Durchmessern	
Polyester Garn 5/0		FSSB Jestetten, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Eppendorf Tubes	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Schraubdeckeltubes	Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Skalpel 10er, 11er, 20er	Feather® Disposal Scalpel	Pfmmedical AG Köln, Deutschland
Urinbecher (100 ml)		Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Zellstofftupfer (4 x 5 cm)	Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland

Tabelle 3.4: Geräte/Materialien/Software für Gavage, Lungenfunktions- und Hämodynamik-Messungen

Gerät/Material/Software	Synonym/Bemerkung	Firma
Arterienclip	Aesculap® Biemer Clip	Aesculap AG Tuttlingen, Deutschland
Beatmungspumpe	MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik March, Deutschland
Blutgasanalysegerät	348	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany
Computer mit Monitor		
Druckaufnehmer	APT 300	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Druckaufnehmer für Lungenfunktionsmessung	Differential Pressure Transducer MPX Typ 399/2	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod. II for arterial Blood Pressure Measurement	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Druckwandler für Lungenfunktionsmessung	DT BNC Box USB 9800 Series Data Translation®	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Einhängewärmethermostat	Ed	Julabo Temperiertechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Hämatokrit-Zentrifuge	Hämatokrit 210	Hettrich Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland
Katheter für A. carotis	Micro Cannulation System	FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Katheter für V. jugularis	Hyman Mouse Pressure Catheter 14 cm	Nu MED Inc. Hopkinton, USA
Operationsbesteck		FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Plexiglaskammer, gefüllt mit ca. 40 °C warmen Wasser		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Pneumotachometer		Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Schlundsonde		FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Software von HSE	PULMODYN®W Labtech Pro®	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Spülkanüle	Pulmonalarterieller Katheter Sondeanfertigung für ILU1	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Stativ	Zum Halten der Spritzen während des Spülens	
Tierwaage (groß)		August Sauter GmbH, Albstadt-Ebingen
Tierwaage (klein)	TEE 150/1 max. 150 g	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Trachealtubus	aus Vasofix® Safety 20G ohne Mandarin	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Vergrößerungslupe	MS5	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

Tabelle 3.5: Geräte/Software/Makros für histologische Untersuchungen

Gerät/Software/Makro	Synonym/Bemerkung	Firma
Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
geschlossener Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makro für - Muskularisierungsgrad - Alveolar-Morphometrie - Zellzählung		entwickelt von Hr. Christoph Frank (Informatiker), Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli-Q®	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Schüttelgerät	Eb Swip KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank		Memmert GmbH & Co KG Schwabach, Deutschland

Tabelle 3.6: Verbrauchsmaterialien für histologische Untersuchungen

Verbrauchsmaterial	Synonym/Bemerkung	Firma
Deckgläser (24 x 36 mm)		R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Eindeckmedium	Xylol-lösliches Pertex®	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Mikrotomklingen S 35	Feather	Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Pinsel		Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Selecta Faltenfilter		Schleicher + Schüll GmbH Dassel, Deutschland

Tabelle 3.7: Lösungen, Kits und Antikörper für histologische Färbungen

Lösung/Kit/Antikörper	Synonym/Bemerkung	Firma
Albumin bovine Fraction V	BSA	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Anti- von Willebrand Faktor polyclonal, rabbit anti-human	Verdünnung 1:900 mit 10 %igem BSA	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Anti-alpha-smooth muscle Actin; Clone 1A4 monoclonal, mouse anti-human	Verdünnung 1:900 mit 10 %igem BSA	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Anti-Rabbit-Nitrotyrosin	Verdünnung 1:250 in 10 %igem BSA	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
DAB Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, pro analysi	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck Darmstadt, Deutschland
Eosin-y-alkoholisch		Thermo Shandon Limited Astmoor, Runcorn, Cheshire, England
Ethanol 70 %ig, 96 %ig, 99,6 %ig	vergällt mit Ethylmethylketon	Fischer Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5 – 3,7 %ig	neutral gepuffert mit Methanol stabilisiert	Otto Fischer GmbH & Co. KG Saarbrücken, Deutschland
Hämalaun nach Mayer, sauer.		Division Chroma Münster, Deutschland
ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
ImmPRESS KIT Anti-Rabbit Ig Peroxidase		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Isopropanol (99,8 %ig)		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat pro analysi	KH_2PO_4	Merck Darmstadt, Deutschland
Methanol, reinst		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Methylgrün Counterstain		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Natriumchlorid pro analysi	NaCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
R.T.U. Horseradish		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Salzsäure 25 %ig	HCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Digest All 2®	Zytomed Berlin, Deutschland
Vector VIP®Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector®M.O.M. Immunodetection Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %ig pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Xylol		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3.8: Verwendete Geräte für Zellkulturuntersuchungen

Gerät	Synonym/Bemerkung	Firma
Mikroskop	DMR	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Heraeus (Ofen)		Hilder & Kretschmer, Gießen, Deutschland
Magnetischer Konzentrierer	Dynal MPC-1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Neubauer-Zählkammer		LO – Laboroptik GmbH, BadHomburg, Deutschland
Sterilbank	HERA Safe	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Szintillationszählers		Packard Bioscience (jetzt Perkinelmer); Meriden, USA
Tischzentrifuge	Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Waage für Substanzen	Mettler Toledo PL 303	Mettler Toledo, Schweiz
Zellinkubator	HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge	Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3.9: Verbrauchsmaterialien für Zellkulturuntersuchungen

Verbrauchsmaterial	Synonym/Bemerkung	Firma
8-Well Chamber Slides		BD Falcon™ Heidelberg, Deutschland
Cell Strainer 352350	70 µm Sieb-Filter	BD Falcon™ Heidelberg, Deutschland
Fibronectin-beschichtete Zellkulturschalen	Fibronectin CELLCOAT®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nylon-Membran		Amersham Hybond™-N + GE Healthcare, München
Petrischalen		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten	5, 10, 25, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter	Porengröße 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Sterilfilterspitzen		Nerbe plus GmbH, Wiesen/Luhe, Deutschland
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 3.10: Lösungen, Kits, Assays und Antikörper für Zellkulturuntersuchungen

Lösung/Kit/Assay/Antikörper	Synonym/Bemerkung	Firma
³ H-Thymidin		Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
Albumin bovine Fraction V	BSA	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Anti- von Willebrand Faktor AK	Antikörper, Endothelzellen	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
CaspACE Assay System Colorimetric		Promega, Mannheim, Deutschland
Dispase		GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline	DPBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dynabeads M-450		GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Endothelzell-Wachstums-Medium	low serum endothelial cell growth medium; C-22020	Promocell Heidelberg, Deutschland,
Fetales Kälberserum	FCS	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Hanks' balanced salt solution	HBSS	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	KOH	Merck, Darmstadt, Germany
L-Glutamin		PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Medium 199	M199	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)		PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Phosphate buffered Saline	PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Serotonin		Abcam®, Cambridge, UK
Staurosporin		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tergurid		Firma Ergonex Pharma GmbH, Deutschland
Trypsin		Invitrogen, Camarillo, CA, USA
Trypsin/EDTA (1x)		PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 3.11: Geräte für molekularbiologische Untersuchungen

Gerät	Synonym/Bemerkung	Firma
Bio Imaging System	ChemiGenius	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresekammer		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Entwicklermaschine	Crurix	Agfa Morstel, Belgien
Färbekammer		Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Homogenisator	Precellys 24	Peqlab Erlangen, Deutschland
Kryostat	(CM 1850UV)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrodissektionssystem	LMD 600	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroplattenlesegerät (1)	Elx808	Bio Tek Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikroplattenlesegerät (2)	Molecular Devices Versamax Microplatereader	MDS Analytical Technologies Ismaning, Deutschland
Mikrozentrifuge	200R	Hettich Tuttlingen, Deutschland
Real Time PCR System	Mx3000P®QPCR System	Agilent (Stratagene), Waldbronn, Deutschland
Semidry-Blot-System		Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Spannungsgerät für Elektrophorese		Biometra Göttingen, Deutschland
Spektrometer, NanoDrop	ND-1000	Kisker-Biotech Steinfurt, Deutschland
Thermoblock	VWR	Bruchsal, Deutschland
Thermocycler	T-personal	Biometra Göttingen, Deutschland
Vertikal-/Horizontalschüttler		Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland

Tabelle 3.12: Verbrauchsmaterialien/Lösungen/Chemikalien für molekularbiologische Untersuchungen

Verbrauchsmaterial/Lösung/Chemikalie	Synonym/Bemerkung	Firma
2 ml Schraubverschluss-Gefäß	Mikro-Schraubröhre	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
4x NuPage LDS		Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
6x Loading Dye	Ladepuffer, Gelelektrophorese	Fermentas St. Leon Rot, Deutschland
96-well Mikroplatten		Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
Acrylamid/Bis		Serra Nürnberg, Deutschland
Agarose		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL GE		GE Healthcare München, Deutschland
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

Verbrauchsmaterial/Lösung/Chemikalie	Synonym/Bemerkung	Firma
Aqua dest.		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Bluecaps		Braun Meldungen, Deutschland
Chemilumineszenzfilm	Cronex 5 Medical X-Ray Film	Agfa, Morstel, Belgien
Complete™ Protease Inhibitor		Roche, Basel, Schweiz
Deckglas		R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Destilliertes Wasser	(dH ₂ O, DNase-/RNase-frei)	Gibco™ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	70 %ig, 96 %ig und 100 %ig	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Glycin		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Hämalun		Waldeck, Münster, Deutschland
Kalziumchlorid	CaCl ₂	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Keramikkügelchen	1,4 mm	Peqlab Erlangen, Deutschland
Membran Slides		Microdissect GmbH, Herborn, Deutschland
Milchpulver	Skim Milk	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Na-Orthovanadat (200 mM)		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Natriumazid	NaN ₃	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF (100 mM)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Polyvenylidendifluorid-Membran	PVDF-Membran	Pall Corporation Dreieich, Deutschland
Real-time PCR-Reaktionsgefäße		Thermo-Fischer (Abgene), Hamburg, Deutschland
RNA-Lyse-Puffer	RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNaseZap®		Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure 37 %ig, rauchend	HCl 37 %ig	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)	Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
SYBR safe DNA gel stain		Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS-Pulver 0,5M pH 6,8	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS-Pulver 1,5M pH 8,8	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

Verbrauchsmaterial/Lösung/Chemikalie	Synonym/Bemerkung	Firma
Tween 20		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Whatman-Filter		Schleicher & Schuell Dassel, Deutschland
β -Mercaptoethanol		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

Tabelle 3.13: Kits und Standards für molekularbiologische Untersuchungen

Kit/Standard	Synonym/Bemerkung	Firma
DC Protein Assay		Bio-Rad München, Deutschland
DNA-Standard	GeneRuler™ 100bp Ladder	Fermentas St. Leon-Rot, Deutschland
iScript cDNA-Synthese Kit		Bio-Rad München, Deutschland
iTaq™SYBR®Green Supermix		Bio Rad München, Deutschland
peqGOLD total RNA Kits		Peqlab Erlangen, Deutschland
Proteinstandard	Precision Plus Protein™ Standards (Dual Color)	Bio-Rad München, Deutschland
RNase-free DNase Set		Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini u. Micro Kit		Qiagen, Hilden, Deutschland
Serotonin Research ELISA Kit,	BAE-5900	Labor Diagnostika NORD GmbH & Co.KG, Deutschland

3.1.1 Primerdesign und verwendete Primer

Die Primersequenzen wurden mit dem frei verfügbaren Programm „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) ermittelt und von der Firma Metabion International AG (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Damit alle Primer mit demselben PCR-Programm verwendet werden konnten, wurden die jeweiligen Sequenzen so gewählt, dass ihre Schmelztemperaturen zwischen 61 und 63 °C lagen. Alle Primer wurden so entwickelt, dass intron-überspannende cDNA-Produkte amplifiziert wurden. Die Primer wurden im lyophilisierten Zustand geliefert und entsprechend einer 100 μ M Ausgangslösung gelöst. Vor der Verwendung wurden die Primer weiter um 1:10 verdünnt. Folgende Primer wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tabelle 3.14: Auflistung der verwendeten Primer-Paare

PBGD = Porphobilinogen deaminase; 5-HTR_{2A} = Serotonin Rezeptor 2A; 5-HTR_{2B}
 = Serotonin Rezeptor 2B; 5-HTT = Serotonin Transporter; F = Forward (vorwärts);
 R = Reverse (rückwärts)

Gen	Spezifität		Primersequenz
PBGD	Maus	F	5'-GGGAACCAGCTCTCTGAGGA-3'
		R	5'-GAATTCCTGCAGCTCATCCA-3'
5-HTR _{2A}	Maus	F	5'-CCAGAACCAAAGCCTTCCTG-3'
		R	5'-CCATGATGGTTAGGGGGATG-3'
5-HTR _{2B}	Maus	F	5'-CAGGCCAATCAGTGCAACTC-3'
		R	5'-AAGCGGTCCTTTGTCAGCTC-3'
5-HTT	Maus	F	5'-AGCGACGTGAAGGAAATGCT-3'
		R	5'-GGAGTTGGGGTGGACTCATC-3'
PBGD	Human	F	5'-CCCACGCGAATCACTCTCAT-3'
		R	5'-TGTCTGGTAACGGCAATGCG-3'
5-HTR _{2A}	Human	F	5'-AGCCGCTTCAACTCCAGAAC-3'
		R	5'-ATCGGCGAGTAAGCAACTCC-3'
5-HTR _{2B}	Human	F	5'-CTCACGGGCTACAGCATTCA-3'
		R	5'-ATCGCCAAAACGTTTCCTTTG-3'
5-HTT	Human	F	5'-CTTTCATTTGCATCCCCACA-3'
		R	5'-CACAGCATTCAAGCGGATGT-3'

3.1.2 Antikörper für Western Blot

Für die Durchführung der Western Blot-Analysen wurden die in Tabelle 3.15 aufgeführten Antikörper (AK) verwendet. Alle Antikörper wurden in 6 % (w/v) Milch/TBST [Tris gepufferter Kochsalzlösung mit Tween (*trisbuffered saline with tween*)] verdünnt.

Tabelle 3.15: Verwendete Antikörper für Western Blot-Analysen

Antikörper	Firma	Bezeichnung	verwendete Verdünnung
Primäre Antikörper			
anti-nitrotyrosine	Abcam, Cambridge, UK	ab7048	1:1000
anti-β-actin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	A5316	1:30000
anti-5-HT _{2A}	Abcam, Cambridge, UK	ab16026	1:1000
anti-5-HT _{2B}	Abcam, Cambridge, UK	ab107182	1:1000
anti-5-HTT	Abcam, Cambridge, UK	ab102048	1:1000
Sekundäre Antikörper (Peroxidase gekoppelt)			
anti-rabbit	Promega, Mannheim, G	W401B	1:5000
anti-mouse	Promega, Mannheim, G	W402B	1:5000

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere und Forschungsobjekte

3.2.1.1 C57BL/6J-Maus

Für die Versuche wurden männliche C57BL/6J Wildtyp (WT) – Mäuse (*Mus musculus*) verwendet. Der Stamm C57BL/6 wurde 1921 von C. C. Little durch eine Kreuzung von einer weiblichen N.57 und einer männlichen N.52 in einem Aufzuchtzentrum der Vereinigten Staaten (Miss Abby Lathrop) entwickelt. 1948 wurde dieser Mausstamm bei Jackson Laboratory USA (daher der Zusatz „J“ für Jackson [217]), 1948 bei Charles River Laboratories France und 2004 in England eingeführt. Die Zucht der Mäuse wird gemäß des Jackson Laboratory genetischen Managementsystems bestimmt. Die Tiere der vorliegenden Arbeit wurden von dem Lieferant Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland bezogen. C57BL/6 Mäuse werden vor allem in der biomedizinischen Grundlagenforschung zur Forschung an humanen Erkrankungen verwendet. Die C57BL/6J Maus war die erste Linie, bei der das Genom vollständig sequenziert wurde. Ausgezeichnet wird dieser Inzuchtstamm durch seine besonders kongene Verfügbarkeit, seine leichte Aufzucht und seine Robustheit. Des Weiteren ist dieser Stamm unempfindlich für viele Arten von Tumoren. Er ist besonders anfällig für eine Diät-induzierte Fettleibigkeit, Typ-2 Diabetes und Atherosklerose, so dass diese Mäuse gerne als Tiermodelle für die entsprechenden Krankheiten eingesetzt werden [218].



Abbildung 3.1.: C57BL/6J (Quelle: criver.com) [218]

Das Gewicht der Mäuse betrug bei Anlieferung 19-20 g, was einem Alter von etwa sechs Wochen entspricht. Die Tiere wurden im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen für den Zeitraum der Versuche gehalten. Die Tiere wurden in mehrere Versuchsgruppen aufgeteilt und in Polycarbonat-Käfigen Typ IV mit Einstreu, Nistmaterial und Versteckmöglichkeiten gehalten, wobei die Anzahl in den einzelnen Käfigen den Standard-Haltungsbedingungen entsprach. Die Fütterung (Altromin 1324, Haltungsdiät für Mäuse) und die Wasserzufuhr (Leitungswasser) der Mäuse erfolgte *ad libitum*. Der Tag-

/Nachtrhythmus im Tierstall betrug 13/11, die mittlere Umgebungstemperatur lag bei 20 - 23 °C und die Luftfeuchtigkeit betrug 40 - 70 %. Vor der Applikation von Tergurid oder Placebo wurde das genaue Gewicht der Tiere bestimmt.

3.2.1.2 Rauchexposition

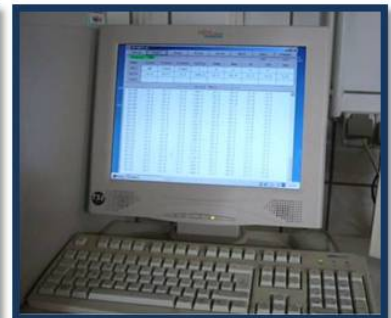
C57BL/6J Wildtyp-Mäuse wurden 6 Stunden pro Tag, 5 Tage pro Woche in einer Rauchkammer einer Rauchmaschine (siehe Abbildung 3.2) dem Hauptrauchstrom von 3R4F-Forschungs-Zigaretten (Kentucky Tobacco Research and Development Centre, Lexington, KY, USA) für bis zu 8 Monate ausgesetzt. Diese Zigaretten sind in ihrer Zusammensetzung standardisiert und es wurde eine konstante Partikel-Konzentration von 140 mg/m^3 in der Rauchkammer erzeugt. Zur Generierung des Zigarettenrauchs wurde ein kommerzieller Rauchgenerator eingesetzt. Das Verrauchen von Zigaretten erfolgte mit anschließender Verdünnung dieses Hauptstromrauches mit Frischluft. Der maximale Wert am Arbeitsplatz (MAK-Wert) von Kohlenmonoxid beträgt 30 ppm. Dieser Wert wurde bei einer Rauchkonzentration von 140 mg/m^3 nicht erreicht, so dass eine entsprechende Gefährdung der Mäuse ausgeschlossen wurde. Um verschiedene Effekte des Alterungsprozesses zu kontrollieren, wurden als Kontrollgruppe C57BL/6J Wildtyp-Mäuse verwendet, die in Umgebungsluft mit 21 % Sauerstoff gehalten wurden.



a) Rauchgenerator



b) Rauchkammer für C57BL/6J-Mäuse



c) Kontinuierliche Überwachung von wichtigen Parametern

Abbildung 3.2 a-c: Aufbau der Rauchmaschine in Darstellung der einzelnen Einheiten.

3.2.1.3 Behandlung der Tiere mit Tergurid

Tergurid lag als kristalline Reinsubstanz (Lieferant Firma Ergonex Pharma GmbH) vor. Zunächst wurde eine 50 mmol/l Tergurid-Stammlösung angesetzt, die bei -20 °C bis zu einer Woche stabil gelagert werden konnte. Bei Raumtemperatur wurden dazu pro ml Stammlösung 17 mg Tergurid in 500 µl 50 %igem Ethanol gemischt und anschließend äquimolar mit 500 µl einer 1 N HCl-Lösung zu einem klaren homogenen Gemisch gelöst, welches aliquotiert und eingefroren wurde. Hinsichtlich der Bioverfügbarkeit in der Maus wurde eine Dosis von 1 mg/kg in einem Volumen von 200 µl H₂O zweimal täglich jeweils eine Stunde vor und nach Rauchexposition per Gavage appliziert. Bei einem Applikationsvolumen von 10 ml/kg Körpergewicht entspricht dies einer Applikationslösung von 0,1 mg Tergurid/ml mit einem Ethanolgehalt von < 3 %. Das Lösungsgemisch aus 50 %igem Ethanol und 1 N HCl ohne Tergurid wurde als Placebo für die Kontrolltiere verwendet.

3.2.1.3.1 Versuchsgruppen

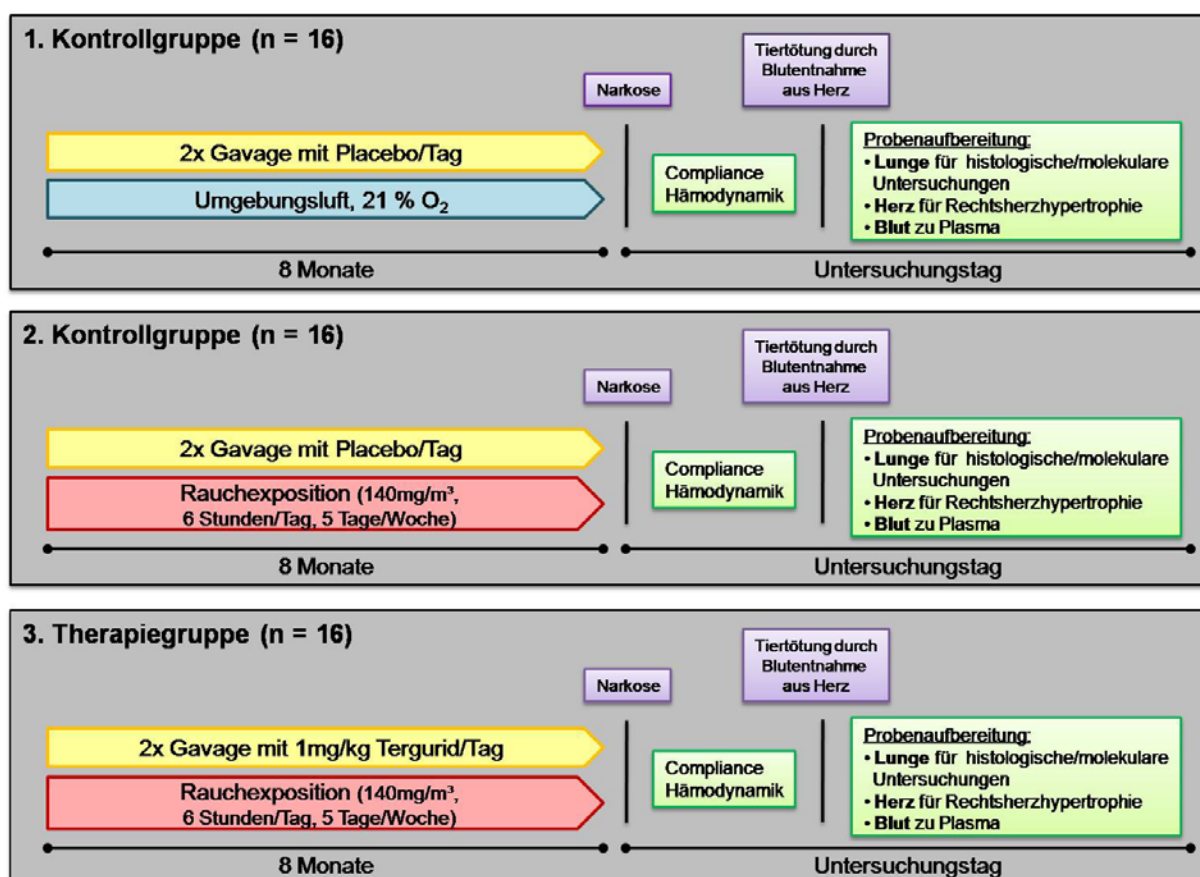


Abbildung 3.3: Behandlungsgruppen des 8 monatigen Terguridversuchs.

Die Mäuse (C57BL/6J) wurden für 8 Monate mit Umgebungsluft- bzw. Rauch-exponiert und wie angegeben behandelt. Die Verabreichung von Tergurid bzw. Placebo erfolgte in 200 µl H₂O/Tier jeweils eine Stunde vor und nach Rauchexposition per Schlundsonde. Am Untersuchungstag wurden, nach Narkotisierung der Maus, Compliance und hämodynamische Messungen durchgeführt. Danach erfolgte die Tiertötung in tiefer Narkose mittels Blutentnahme aus dem rechten Ventrikel. Anschliessend wurde eine Hälfte der Lunge für histologische Untersuchungen fixiert. Die andere Hälfte der Lunge wurde für molekulare Versuche in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Herz wurde für die Rechtsherzhypertrophie-Bestimmung präpariert und von dem Blut das Plasma auszentrifugiert.

3.2.1.4 Humanes Lungengewebe

Die Proben von humanem Lungengewebe stammten aus nichttransplantierfähigen Donorlungen (Kontrollen) und COPD-Patienten (GOLD-IV). Das humane Material wurde nach Transplantation entweder direkt oder in Tissue-Tek[®] eingebettet (Sakura Finetek, Staufen) in flüssigem Stickstoff eingefroren oder mit 4,5 %igem Paraformaldehyd fixiert. Die Studien wurden durch die Ethikkommission des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität genehmigt (AZ 31/93).

Tabelle 3.16: Patienten-Charakteristika

	Alter	Ge- schlecht	Pack./ Jahr	Diagnose	FEV ₁ /FVC (%)	FEV ₁ (l)	FEV ₁ /erwartet (%)
1 Donor	24	m	-	-	-	-	-
2 Donor	52	f	-	-	-	-	-
3 Donor	61	f	-	-	-	-	-
4 Donor	26	m	-	-	-	-	-
5 Donor	29	m	-	-	-	-	-
6 Donor	55	f	-	-	-	-	-
1 Raucher/COPD	53	m	39	COPD (Gold IV)	49	1.56	14
2 Raucher/COPD	48	m	31	COPD (Gold IV)	45	0.66	19
3 Raucher/COPD	58	m	70	COPD (Gold IV)	31	0.86	20
4 Raucher/COPD	58	m	88	COPD (Gold IV)	40	1.31	32
5 Raucher/COPD	59	m	5	COPD (Gold IV)	63	0.76	22
6 Raucher/COPD	56	m		COPD (Gold IV)	29	0.56	16

3.2.1.5 Tierversuchsgenehmigung

Alle Experimente wurden entsprechend der EU Richtlinie 86/609/EWG zum Schutz von Versuchstieren durchgeführt und zuvor durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Der dazu gehörende Tierversuchsantrag „Therapie des Lungenemphysems und von Gefäßveränderungen bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) an der Maus durch Tergurid“ kann unter dem Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 17/2009 (Kenn-Nr. JLU: 424 GP) eingesehen werden.

3.2.2 Physiologische Untersuchungen

Jeweils eine Stunde vor Versuchsbeginn erhielten die Mäuse entsprechend der Therapiegruppe entweder Tergurid oder Placebo via Gavage. Zur Hemmung einer Blutgerinnung wurde 30 min vor Beginn der finalen Mauspräparation Heparin (1000 U/kg) intraperitoneal appliziert.

3.2.2.1 Narkose

Die Mäuse wurden i.p. mit einem Gemisch aus Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], 50 mg/kg) und Xylazin (Rompun[®] 2 %, 10 mg/kg) anästhesiert. Die zur Präparation nötige Narkosetiefe wurde anhand des Ausfalles des Zwischenzehenreflexes durch mehrmaliges festen Kneifens mit einer Pinzette an mindestens zwei Gliedmassen getestet, um ein Schmerzempfinden auszuschliessen. Zur Erhaltung der physiologischen Körpertemperatur wurden die Tiere in einer speziell angefertigten temperierten Plexiglas-Kammer platziert. Um die eigene Atmung der Tiere vor der maschinellen Beatmung nicht einzuschränken, wurde die Zunge vorgelagert.

3.2.2.2 Lungenfunktionsmessung

Die Lungenfunktionsmessung bietet eine schnelle und zuverlässige Methode zum Screening von Atemwegserkrankungen. Vor Beginn der Präparation der Mäuse wurde die Datenerfassungs-Software für Atmungs-Experimente PULMODYN[®]W von HSE (Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland; Version 1.5; 2004) gestartet. Die Präparation und Ablauf der Messung wird im Folgenden beschrieben:

3.2.2.2.1 Tracheotomie

Nachdem die Maus die ausreichende Narkosetiefe erlangt hatte, wurde sie innerhalb der speziell angefertigten Plexiglaskammer, in Rückenlage auf einer Gummiunterlage an den beiden vorderen Gliedmaßen fixiert. Um eine Verunreinigung des Operationsfeldes durch Haare zu vermeiden, wurde das Fell der Maus im Halsbereich mit Braunoderm®-Lösung befeuchtet. Zur Erleichterung der Präparation des ventralen Halsbereiches wurden ca. 50 µl des Lokalanästhetikums Lidocain (Xylazin) s.c. injiziert. Anschliessend wurde die Haut im Halsbereich mit Hilfe einer Schere entfernt. Um unnötige Blutungen zu vermeiden, sollte die eröffnete Fläche nicht mehr als 1 x 1 cm betragen. Nun wurden die Speicheldrüsen (*Glandulae mandibulares*) mit Hilfe von feingebogenen stumpfen Pinzetten vorsichtig nach links und rechts gelagert, um die Trachea zur Darstellung zu bringen. Darauf folgend wurden die umliegenden Muskeln zur Seite präpariert, ein chirurgischer Faden unter die Trachea geführt, der anschliessend lose verknotet wurde. Die Trachea wurde zwischen zwei Knorpelspangen direkt unterhalb des Larynx eingeschnitten. Danach wurde ein Tubus (aus Vasofix® Safety 20 G ohne Mandrin) eingeführt und mittels des vorgeknöteten Fadens fixiert. Der Tubus wurde über einen Pneumotachometer an die Beatmungspumpe angeschlossen. Die Beatmung der Mäuse erfolgte mit einer Frequenz von 150 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 10 µl pro g Körpergewicht. Zur Vermeidung eines Kollabierens der Alveolen in der maschinellen Expiration wurde ein positiv-endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule festgelegt. Um die Luftflussgeschwindigkeit mit Hilfe des Pneumotachometers aufzeichnen zu können, wurde dieser über einen expiratorischen und inspiratorischen Schlauch mit einem Differentialdruckabnehmer verbunden und an den PC angeschlossen.

3.2.2.2.2 Datenerfassung

Die Datenerfassung wurde mit Hilfe eines Pneumotachometers durchgeführt. Der Pneumotachometer (Durchflussmesser) enthält einen feinen Maschendraht. Die durch den Maschendraht geatmete Luft führt zu einem kleinen Druckunterschied, der sich proportional zur Durchflussmenge verhält. Die von dem Pneumotachometer registrierte Veränderung des Atemflusses wurde über den Differentialdruckaufnehmer in Spannungs-Signale umgewandelt. Diese analogen Signale wurden folgend mit einem A/D-Wandler in eine für den Computer lesbare Form (digitale Zahlenwerte) umgewandelt. Mittels der Pulmodyn Software wurden die Ergebnisse ausgewertet und gespeichert. Der wichtigste Parameter der Lungenfunktionsmessung war die dynamische Compliance als ein Maß für die Dehnbarkeit

(Elastizität) der Lunge nach Rauchexposition im Vergleich zu Kontrollmäusen. Für die Berechnung der dynamischen Compliance ermittelte die PULMODYN Software bei den Nullwerten der Flusssignale die Korrespondierenden des Atemzugvolumens (tidal volume, TV) und des Pleuraldruckes (Druck zwischen Lunge und Brustkorb). Aus diesen Werten wurden “delta V” und “delta P” errechnet. Die Compliance wurde somit definiert als der Quotient aus Volumenänderung (delta V) und Pleuraldruck (delta P) und mit folgender Formel berechnet [219]:

$$C_{\text{dyn}} = \frac{\text{delta}V}{\text{delta}P}$$

Für die Auswertung wurden jeweils 20 Werte einer konstanten Phase gemittelt.

3.2.2.3 Hämodynamische Messungen

Vor Präparationsbeginn der *A. carotis* und der *V. jugularis* wurden die Druckaufnehmer und Schläuche des Messsystems, der angeschlossene arterielle Katheter und der venöse Katheter mit einer physiologischer Kochsalzlösung luftblasenfrei gefüllt. Zur Aufzeichnung des systolischen arteriellen Druckes (SAP) und systolischen rechtsventrikulären Blutdruckes (RVSP) wurde das Programm Labtech Pro[®] (Labtech Notebook Runtime Version 9.02) verwendet. Vor Beginn der Messungen wurde der arterielle Katheter neben der Arterie und der venöse Katheter neben der *V. jugularis* positioniert und die Ausgangswerte für den SAP und den RVSP durch Einstellung am Druckwandler auf 0 mmHg gesetzt.

3.2.2.3.1 Präparation der linken *A. carotis*

Die linke pulsierende *A. carotis* wurde durch Auseinanderziehen der sie bedeckenden Muskelschichten freigelegt und mittels einer feingebogenen stumpfen Pinzette vorgelagert. Durch ein vorsichtiges Öffnen und Schliessen der Pinzette konnte das umgebene Bindegewebe und der *N. vagus* von der *A. carotis* gelöst und seitlich entfernt werden. Anschliessend wurden zwei chirurgischen Bindfäden untergelegt. Der superior liegende Faden wurde so weit wie möglich im oberen Bereich der *A. carotis* mit zwei einfachen Knoten gebunden, leicht gespannt und mit einem Durapore[®] Klebestreifen seitlich nach rechts über dem Kopf der Maus an der Kammer fixiert, um ein Strecken der *A. carotis* zu gewährleisten. Der untere Bindfaden wurde lose verknötet. Danach wurde die *A. carotis* vor dem Brusteingang mit einem Arterienclip (Aesculap[®] Biemer Clip) abgeklemmt, um ein weiteres Pulsieren des Blutes zu verhindern. Folgend wurde die *A. carotis* durch ein kleines

Loch nahe dem oberen Knoten geöffnet und der Katheter fast bis zum Arterienclip eingeführt. Durch den vorher vorgelegten losen unteren Knoten konnte nun ein Fixieren des Katheters mit der *A. carotis* erfolgen, der Arterienclip gelöst und der SAP aufgezeichnet werden.

3.2.2.3.2 Präparation der rechten *V. jugularis*

Vor der Präparation der rechten *V. jugularis* wurde der Kopf der Maus etwas nach rechts verschoben. Durch ein leichtes nach oben Ziehen der rechten Speicheldrüse wurde die *V. jugularis* mittels vorsichtigem Öffnen und Schliessen einer feingebogenen Pinzette vom umgebendem Bindegewebe gelöst und frei präpariert. Es erfolgte erneut ein Unterlegen zweier chirurgischer Bindfäden. Anhand zweier Knoten des superior liegenden Fadens wurde die *V. jugularis* abgebunden und durch Anbringen des Fadens, seitlich nach links über den Kopf an der Kammer, gestreckt. Der untere Bindfaden wurde lose vorgeknotet und mit einer Pinzette angehoben, damit ein Ausströmen des Blutes durch den nachfolgenden Schnitt in die *V. jugularis* unterhalb des oberen Knotens verhindert wurde. Es folgte das Einführen des Katheters und ein Schliessen des vorgelegten Knotens. Anschliessend wurde der Katheter bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben und der RVSP aufgezeichnet. Der systolische rechtsventrikuläre Druck entspricht bei intakter Pulmonalklappe dem systolischen pulmonal-arteriellen Druck [220].

3.2.2.3.3 Messung des arteriellen und rechtsventrikulären Druckes

Die gemessenen Drücke (SAP und RVSP) wurden als analoge Signale durch die flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer registriert und verstärkt. Diese wurden dann mit Hilfe einer Wandlerkarte im PC in digitale Signale umgewandelt und durch das Programm Labtech Pro[®] aufgezeichnet. Sobald ein konstantes Plateau der Messwerte erreicht wurde, wurde die Messung abgeschlossen.

3.2.2.3.4 Messung des arteriellen Sauerstoff-Partialdruckes

Direkt nach der Messung der hämodynamischen Druckwerte wurde aus dem arteriellen Katheter der *A. carotis* Blut in eine Kapillare aufgenommen. Dabei war darauf zu achten, dass das Blut nicht mit der Umgebungsluft in Verbindung kam, um eine Erhöhung des Sauerstoff-Partialdruckes durch diese zu vermeiden und eine Verfälschung der Werte auszuschließen. Der arterielle Sauerstoff-Partialdruck (pO_2) wurde anschließend in einem Blutgasanalysegerät 348 (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany) gemessen.

3.2.2.4 Hämatokrit-Messung

Vor dem Einführen des rechtsventrikulären Katheters in die *V. jugularis* wurde ein Tropfen des ausgetretenen Blutes mit einer Kapillare zur Messung des Hämatokrits aufgefangen. Diese wurde mit Knete aus einem Hämatokritversiegelungskit verschlossen und bei Raumtemperatur mit 16060 g (13000 rpm) für 4 Minuten zentrifugiert (Hämatokrit 210, Hettich Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland). Anschliessend wurde der Hämatokrit auf der Hämatokritskala des Zentrifugendeckels abgelesen.

3.2.2.5 Blutentnahme

Nach den hämodynamischen Messungen wurde gemischt-venöses Blut (ca. 1 - 1,5 ml) aus dem rechten Ventrikel entnommen. Somit erfolgte eine rasche Tötung der Maus durch Kreislaufstillstand unter Narkose. Das Blut wurde direkt in ein Eppendorf-Gefäß umgefüllt und bei 4 °C bei 95,03 g (1000 rpm) für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich Mikro 200R, Hettich Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland). Das überstehende Plasma wurde aufgezogen und bei -80 °C tiefgefroren.

3.2.2.6 Entnahme und Fixierung der Lunge

Nach der Blutentnahme und Tötung des Tieres wurden der Thorax und das Abdomen mit Braunoderm[®] befeuchtet. Anschliessend wurde die Haut sowohl am Thorax medial als auch entlang des unteren Rippenbogens lateral aufgeschnitten. Mit einer feinen Pinzette wurde nun das Sternum erfasst und das Diaphragma mit einer Federschere aufgeschnitten. Danach wurde das Sternum in der Mitte durchtrennt und die Rippen seitlich mit einer gebogenen 24 G Kanüle fixiert. Unter der *A. pulmonalis* und Aorta wurde nun ein chirurgischer Faden durchgeführt und ein Knoten lose vorgelegt. Anschliessend erfolgte ein kleiner Schnitt in den rechten Ventrikel, durch den eine Spülkanüle in die *A. pulmonalis* eingeführt und durch Schliessen des Knotens fixiert wurde. Zum Abfluss der Spüllösung wurde der linke Ventrikel eingeschnitten. Darauf folgend wurde die Lunge über die *A. pulmonalis* mit einer isotonischen Kochsalzlösung bei einem Druck von 22 cm Wassersäule blutfrei gespült. Nach dem Spülvorgang wurde der Tubus aus der Trachea entfernt und eine 20 G Braunüle ohne Mandrin eingeführt. Je nach Verwendungszweck wurde die Lunge nun folgendermassen weiter behandelt: Für molekulare Untersuchungen wurde ca. 1 ml Tissue Tek[®] (Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) über die Trachea in die Lunge instilliert. Anschliessend wurde das Organ in flüssigem Stickstoff gefroren. Alternativ wurde die rechte Lungenhälfte von der

linken Lungenhälfte mit einem Faden abgebunden. Nach Abtrennung der rechten Hälfte wurde diese direkt für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Für die vaskuläre Morphometrie wurde nun in die linke Lungenhälfte über die tracheale Braunüle eine isotonische Kochsalzlösung mit einem Druck von 12 cm Wassersäule eingeleitet, um ein Kollabieren der Alveolen zu verhindern. Zeitgleich wurde eine 10 -15 minütige Fixierung mit 3,5% Formalin bei einem Druck von 22 cm Wassersäule über die Spülkanüle in der *A. pulmonalis* durchgeführt. Für die alveolare Morphometrie wurde 3,5 %iges Formalin mit einem Druck von 22 cm Wassersäule über die tracheale Braunüle in die linke Lungenhälfte eingeleitet und die Lunge für 10 Minuten fixiert. Nach Beenden der alveolaren oder vaskularen Fixierung wurden die Spülvorrichtungen aus Trachea und *A. pulmonalis* entnommen und die linke Lungenhälfte vorsichtig aus dem Tier präpariert. Anschliessend wurden die Lungen in Einbettkassetten gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur in 3,5 %igem Formalin gelagert. Am folgenden Tag wurde die fixierte linke Lungenhälfte in 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) bei 4 °C umgelagert. Am 3. Tag wurde sie in 50 %igem Ethanol und am 4. Tag in 70 %igem Ethanol überführt. Danach wurden die nun dehydrierten Lungen über Nacht im Routineprogramm eines geschlossenen Vakuumgewebe-Infiltrationsautomaten (Leica TP1050) weiter entwässert. Darauf folgend wurden sie mit Hilfe einer Paraffinausgussstation in Paraffin eingebettet und auf einer Kühlplatte herunter gekühlt. In diesem Zustand wurden die Lungen bis zu weiteren histologischen Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2.7 Messung der Rechtsherzhypertrophie

Bei allen Tieren der jeweiligen Therapiegruppen wurde die Herzratio als Maß der Rechtsherzhypertrophie gemessen. Die Herzen wurden zunächst isoliert und von Perikard, Fettgewebe, Herzohren (Vorhofohren, *auriculae atrii*), sowie vom Aortenbogen befreit. Anschliessend wurde der rechte Ventrikel (RV) fein säuberlich vom linken Ventrikel (LV) plus Septum (S) separiert und auf einem Objektträger drei Tage bei 37 °C getrocknet. Die Herzratio errechnet sich aus dem Gewichts-Verhältnis vom rechten zum linken Ventrikel plus Septum ($RV / LV+S$).

3.2.3 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Die in Paraffin eingebetteten Lungen wurden mit Hilfe eines Mikrotoms in 3 µm dünne Schnitte geschnitten, auf Objektträger gezogen und zum Trocknen auf eine 40 °C warme Heizplatte gelegt. Bis zur Verwendung wurden die Schnitte in einem Wärmeschrank bei 37 °C gelagert.

3.2.3.1 Alveolare Morphometrie

3.2.3.1.1 Hämatoxylin–Eosin (HE)-Färbung

Für die alveoläre Morphometrie der Lungengewebschnitte wurde eine histologische Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach folgendem Protokoll (siehe Tabelle 3.17) verwendet. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur.

Tabelle 3.17: Färbeprotokoll für die HE-Färbung am Mauslungengewebe

Schritt	Inkubationsdauer (min)	Reagenz	Anmerkung
1	60	Wärmeschrank	Deparaffinieren bei 58-60 °C
2	10	Xylol 1	Ablösen des Paraffins
3	10	Xylol 2	Ablösen des Paraffins
4	10	Xylol 3	Ablösen des Paraffins
5	5	Ethanol (99,6 %ig)	Rehydrierung
6	5	Ethanol (99,6 %ig)	Rehydrierung
7	5	Ethanol (96 %ig)	Rehydrierung
8	5	Ethanol (70 %ig)	Rehydrierung
9	2	Aqua dest.	Waschen
10	20	Hämalaun nach Mayer, sauer.	Anfärben der Zellkerne (bläulich)
11	5	H ₂ O (Leitungswasser), fließend	Waschen
12	1	Ethanol (96 %ig)	Dehydrieren
13	4	Eosin-y-alkoholisch	Färbt eosinophile Strukturen (Zellplasmae Proteine) rot
14	Abspülen	Aqua dest.	Waschen
15	2	Ethanol (96 %ig)	Dehydrieren
16	2	Ethanol (96 %ig)	Dehydrieren
17	5	Ethanol (99,6 %ig)	Dehydrieren
18	5	Isopropylalkohol (99,8 %ig)	Dehydrieren
19	5	Xylol 1	Dehydrieren
20	5	Xylol 2	Dehydrieren
21	5	Xylol 3	Dehydrieren
22		Eindecken mit Pertex®	

3.2.3.1.2 Morphometrische Analyse der Alveolen

Die morphometrische Analyse wurde unter einem Lichtmikroskop (Leica DMLA) und unter Anwendung eines computergestützten Programmes der Firma Leica (Leica Q Win Standard Analyzing Software) in Kombination mit für die alveoläre Morphometrie entwickelter Makros analysiert. Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Lungenschnitte wurden für die Auswertung geblindet, um Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Untersuchungsgruppen zu vermeiden.

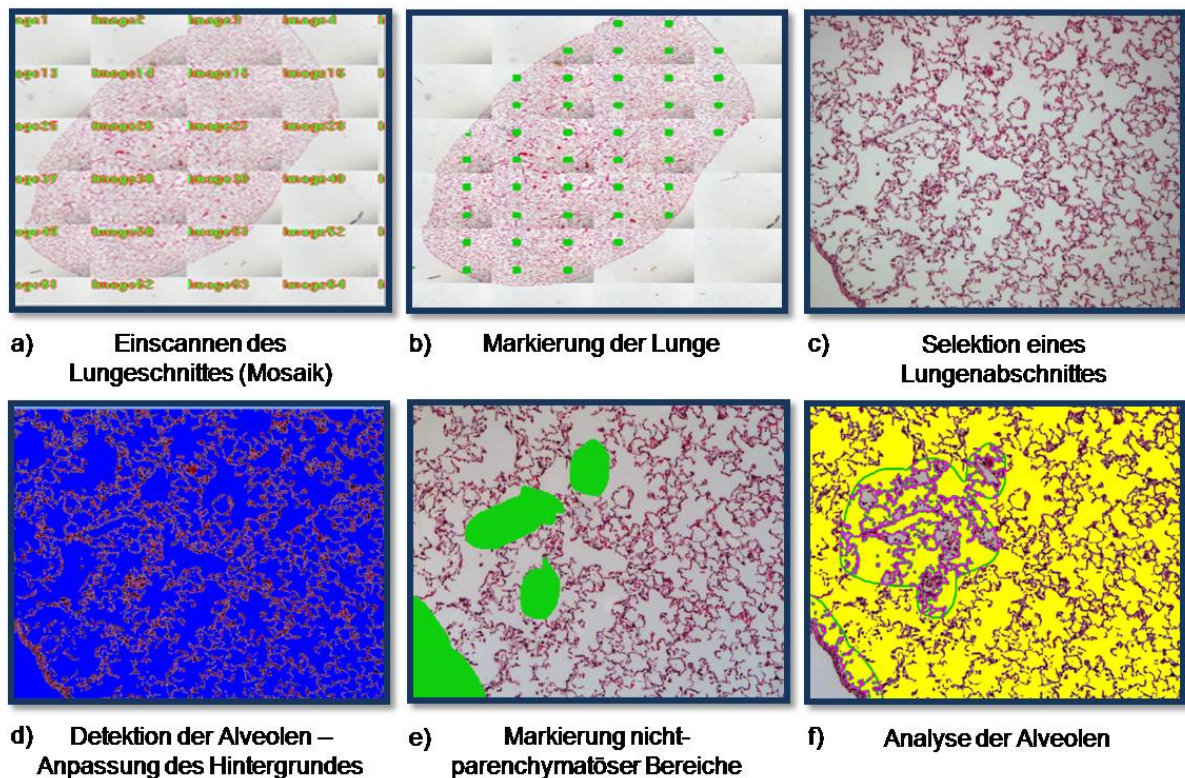


Abbildung 3.4a-f: alveoläre Morphometrie

Der gesamte Hämatoxylin-Eosin gefärbte Lungenschnitt wurde bei 5-facher Vergrößerung eingescannt und softwaregesteuert in Mosaik unterteilt (Abbildung 3.4a). Anschliessend erfolgte ein manuelles Markieren der Lunge (grüne Punkte; Abbildung 3.4b), um nur eine Auswertung von Mosaikbildern mit Lungengewebe zu gewährleisten. Für die Analyse wurden 50-100 dieser Mosaikbilder bei 10-facher Vergrößerung untersucht. Die Selektion eines Lungenabschnittes auf dem Analysefeld wurde automatisch von der Software ermittelt. Da die Auswertung auf einer von Leica speziell entwickelten kolorimetrisch-spektrometrischen Messung basierte, erfolgte eine Unterscheidung des Lungengewebes (gelb) von den Lufträumen (grau) mittels der verschiedenen Farben (Abbildung 3.4f). Durch das Programm

wurden so der Luftanteil gelb und der Gewebeanteil zunächst grau und durch eine manuelle Bestätigung rosa-violett eingefärbt (Abbildung 3.4c-f). Nicht-parenchymale Bereiche (z.B. Gefäße, Bronchien) auf dem Analysefeld konnten vorher manuell markiert werden (grün umrandet, Abbildung 3.4e) und wurden bei der Analyse der Alveolen ausgeschlossen (Abbildung 3.4f). Mit Hilfe der Software wurde nun die respiratorische Fläche des Lungengewebes vermessen und folgende Parameter bestimmt:

- mean linear intercept → mittlere Abstand zwischen Alveolarsepten
- septal wall thickness → mittlere Septendicke
- air space → Gesamtluftanteil in den Alveolen

Die Werte der Parameter wurden direkt in Microsoft® Excel überführt und gespeichert.

3.2.3.2 Vaskuläre Morphometrie

3.2.3.2.1 Doppelfärbung

Für die vaskuläre Morphometrie von dem Lungengewebe der Maus wurde eine Doppelfärbung (1. AK: *alpha smooth muscle actin*; 2. AK: von Willebrand Faktor) mit Peroxidase nach dem folgenden Protokoll (siehe Tabelle 3.18) durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur.

Tabelle 3.18: Färbeprotokoll für die Doppelfärbung mit Peroxidase am Mauslungengewebe

Schritt	Inkubationsdauer (min)	Reagenz	Anmerkung
1	60	Wärmeschränk	Deparaffinieren bei 58-60 °C
2	10	Xylol 1	Ablösen des Paraffins
3	10	Xylol 2	Ablösen des Paraffins
4	10	Xylol 3	Ablösen des Paraffins
5	5	Ethanol (99,6 %ig)	Rehydrierung
6	5	Ethanol (99,6 %ig)	Rehydrierung
7	5	Ethanol (96 %ig)	Rehydrierung
8	5	Ethanol (70 %ig)	Rehydrierung
9	15	20 ml H ₂ O ₂ (30 %ig) in 180 ml Methanol	Inaktivierung endogener Peroxidasen
10	2 x 5	Aqua dest.	Waschen
11	2 x 5	PBS	Waschen
12	15	1 ml Trypsin (2A) + 2 ml Diluent (2B)	Trypsinverdau (37 °C)
13	3 x 5	PBS	Schüttler

14	15	Streptavidin Blocking	Blockiert endogenes Streptavidin
15	5	PBS	Waschen
16	15	Biotin Blocking	Blockiert endogenes Biotin
17	5	PBS	Waschen auf Schüttler
18	15	10 %iges BSA	Waschen auf Schüttler
19	2 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
20	60	Mouse IG Blocking Reagenz	M.O.M.-Kit (1)
21	3 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
22	5	M.O.M. Diluent/Proteinblocking	M.O.M.-Kit (2)
23	30	Primärantikörper (<i>alpha-smooth muscle actin</i>)	1:900 in 10 %igem BSA verdünnt
24	4 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
25	30	M.O.M. biotinyliertes IgG Reagenz	M.O.M.-Kit (3)
26	4 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
27	30	R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin	
28	3 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
29	ca. 3-4 min	Vector VIP® Substrat Kit	Violettes Chromogen (Mikroskop)
30	5	H ₂ O (Leitungswasser)	Waschen
31	2 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
32	20	10 %iges BSA	Blocken unspezifischer AK-Verbindungen
33	3 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
34	20	Serumblock	ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig (Serum ab dekantieren)
35	30	Primärantikörper (vWF, Rabbit)	1: 900 mit 10 %igem BSA
36	4 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
37	30	Biotinylierter sek. Antikörper	ImmPRESS REAGENT anti-Rabbit Ig Peroxidase
38	4 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
39	20-40 sek.	DAB Substrat Kit	Braunes Chromogen, färbt Endothelzellen braun)
40	5	H ₂ O	Waschen
41	5	Counterstain mit Methylgrün	Auf Heizplatte (60 °C, Darstellung der Zellkerne)
42	1	Aqua dest.	Spülen
43	2	Ethanol (96 %ig)	Dehydrieren
44	5	Isopropanol	Dehydrieren
45	5	Isopropanol	Dehydrieren
46	5	Xylol 1	Dehydrieren
47	5	Xylol 2	Dehydrieren
48	5	Xylol 3	Dehydrieren
49	Eindecken mit Pertex®		

Herstellung einer 10-fach konzentrierten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS):

- 80g NaCl
- 2,0 g KCl
- 11,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 2,0g KH_2PO_4

gelöst in 900 ml Aqua dest.

Die 10-fache Lösung wurde als Einmalpuffer verdünnt und der pH auf 7,4 eingestellt.

3.2.3.2.2 Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades

Die morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades wurde mit Hilfe eines computergestützten Programmes der Firma Leica (Leica Q Win Standard Analyzing Software) durchgeführt. Die Schnitte mit immunhistochemischer Doppelfärbung gegen *alpha-smooth muscle actin* und von-Willebrand-Faktor wurden blind, d.h. ohne Kenntnis der jeweiligen Gruppen, analysiert.

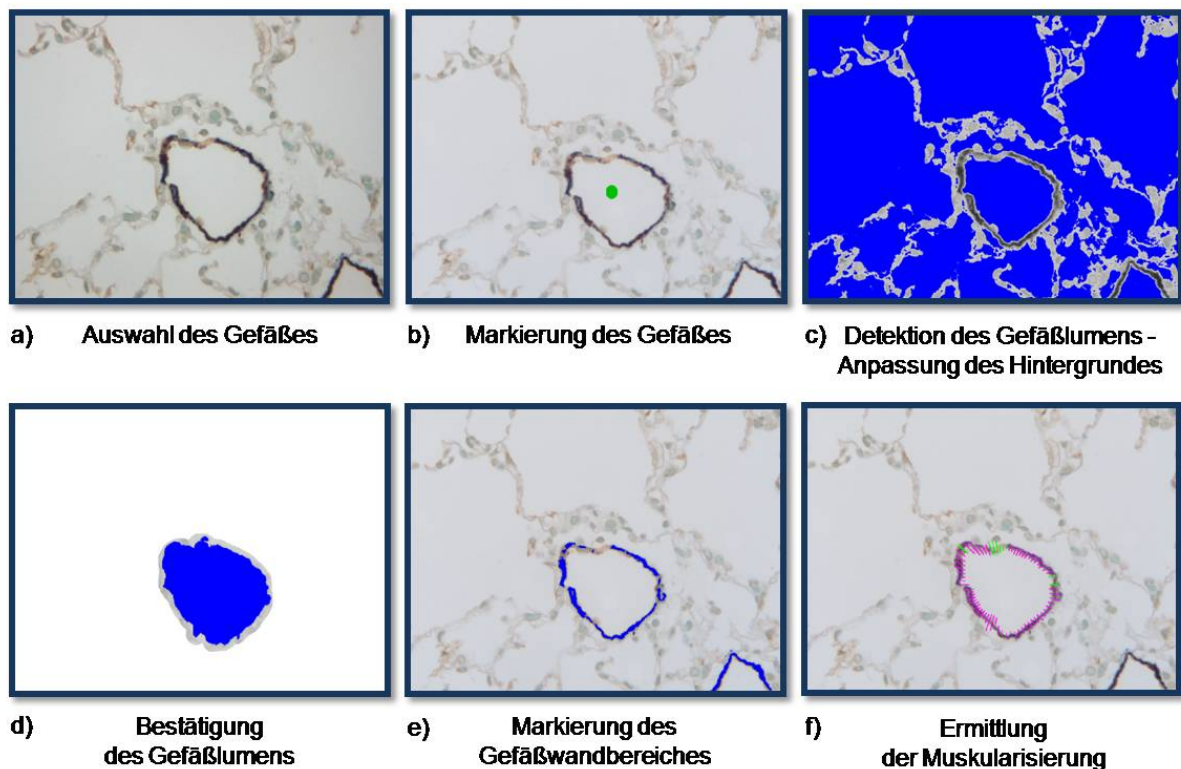


Abbildung 3.5a-f: Bestimmung des Muskularisierungsgrades

Durch die Doppelfärbung wurde die nicht-muskularisierte endotheliale Gefäßwand mithilfe des Antikörpers von-Willebrand-Faktor braun gefärbt. Der muskularisierte Teil der

Gefäßwand wurde über den Antikörper *alpha-smooth muscle actin* markiert und violett angefärbt. Somit konnte der nicht-muskularisierten Bereich von der muskularisierten Gefäßwand unterschieden werden. Um den Muskularisierungsgrad der Gefäße zu ermitteln, wurde mit einer 40-fachen Vergrößerung des Mikroskops die Gefäße zunächst selektiert und manuell markiert (Abbildung 3.5a-b). Nach automatischer Detektion und manueller Bestätigung des Gefäßlumens (Abbildung 3.5c-d) markierte die Software automatisch die Gefäßwand und ermittelte anhand einer durch Leica speziell entwickelten kolorimetrisch-spektrometrischer Messung den Anteil der muskularisierten Gefäßwand (Abbildung 3.5e-f). Pro Mauslunge wurden 80 - 85 kleine Gefäße (externer Gefäßdurchmesser 20 - 70 µm), 10 - 15 mittlere Gefäße (externer Gefäßdurchmesser 71 – 150 µm) und 5 große Gefäße (externer Gefäßdurchmesser > 150 µm) untersucht und in drei Kategorien eingestuft: nicht-muskularisiert, partiell muskulisiert oder voll muskularisiert. Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden folgendermaßen festgelegt:

- nicht-muskularisiert: ≤ 5 % Anteil von *alpha-smooth muscle actin* positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- partiell-muskularisiert: > 5 % - ≤ 75 % Anteil von *alpha-smooth muscle actin* positiven Bereichen in der Gefäßmedia
- voll-muskularisiert: > 75 % Anteil von *alpha-smooth muscle actin* positiven Bereichen in der Gefäßmedia

Die berechneten Werte des Muskularisierungsgrades (%) wurden vom Computerprogramm direkt in eine Exceltabelle überführt, in die jeweiligen Größenkategorien übertragen und gespeichert.

3.2.3.2.3 Bestimmung der Ratio der Alveolen zu den Gefäßen

Das Verhältnis der Alveolen zu den Gefäßen wurde an den vaskulär gefärbten (Doppelfärbung) Schnitten bestimmt. Zunächst wurde die Gesamtfläche der Lunge unter 20-facher Vergrößerung eingescannt. Mit Hilfe eines Programmes der Firma Leica (Leica Q Win Standard Analyzing Software) zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Alveolen markiert und die Anzahl der Alveolen automatisch in eine Exceltabelle überführt. Die Gefäße wurden manuell ausgezählt und in der gleichen Exceltabelle gespeichert. Durch ein systematisches, manuelles Abfahren des kompletten Lungenschnittes entstanden eine Reihe von Einzelwerten zu der Anzahl an Alveolen und Gefäßen, die am Ende summiert und gemittelt wurden. Das Verhältnis der Alveolen zu den Gefäßen wurde anhand der Mittelwerte bestimmt.

3.2.3.3 3-Nitrotyrosin-Färbung

Die 3-Nitrotyrosin-Färbung wurde mit Hilfe eines Peroxidase/ ImmPRESS DETECTION Kit[®] mit Trypsin nach dem folgenden Protokoll (siehe Tabelle 3.19) durchgeführt. Falls nicht anders angemerkt, erfolgten alle Wasch- und Inkubationsschritte bei Raumtemperatur. PBS wurde, wie im Abschnitt zur Doppelfärbung beschrieben, angesetzt.

Tabelle 3.19: Färbeprotokoll für die 3-Nitrotyrosin-Färbung mit Trypsin am Mauslungengewebe

Schritt	Inkubationsdauer (min)	Reagenz	Anmerkung
1	60	Wärmeschrank	Deparaffinieren bei 58-60 °C
2	10	Xylol 1	Ablösen des Paraffins
3	10	Xylol 2	Ablösen des Paraffins
4	10	Xylol 3	Ablösen des Paraffins
5	5	Ethanol (99,6 %ig)	Rehydrierung
6	5	Ethanol (99,6 %ig)	Rehydrierung
7	5	Ethanol (96 %ig)	Rehydrierung
8	5	Ethanol (70 %ig)	Rehydrierung
9	20	100 ml H ₂ O ₂ (30 %ig) in 100 ml Methanol	Inaktivierung endogener Peroxidasen
10	2 x 5	H ₂ O (Leitungswasser)	Waschen
11	2 x 5	PBS	Waschen
12	15	0,5 ml Trypsin (2A) + 1 ml Diluent (2B) Avidin Blocking Reagenz	Trypsinverdau (37 °C)
13	2 x 5	PBS	Schüttler
14	60	10 %iges BSA	Waschen auf Schüttler
15	2 x 5	PBS	Waschen
16	20	2,5 %iges normal Horse Serum ImmPress KIT Anti- Rabbit Ig Peroxidase	Serumblock I, danach Serum nur abklopfen
17	Ca. 18 Std.	Primärantikörper	rabbit anti-Nitrotyrosin (1:250) in 10 %igem BSA
18	4 x 5/ 2Std.	PBS	Waschen auf Schüttler
19	30	Sekundärantikörper	ImmPRESS Reagent Anti-Rabbit Ig Peroxidase
20	3 x 5	PBS	Waschen auf Schüttler
21	5-15	Vektor Vip. Substrat KIT	Entwicklung violett, nach Augenmaß
22	5	H ₂ O (Leitungswasser)	Waschen
23	2-3	Gegenfärbung mit Methylgrün	Auf Heizplatte (60 °C, Darstellung der Zellkerne)
24	1	Aqua dest.	Spülen

25	2	Ethanol (96 %ig)	Dehydrieren
26	2	Ethanol (96 %ig)	Dehydrieren
27	5	Isopropanol	Dehydrieren
28	5	Isopropanol	Dehydrieren
29	5	Xylol 1	Dehydrieren
30	5	Xylol 2	Dehydrieren
31	5	Xylol 3	Dehydrieren
32	Eindecken mit Pertex®		

Die Auswertung der 3-Nitrotyrosin-Färbung erfolgte unter einem Lichtmikroskop (Leica DMLA) bei 20-facher und 40-facher Vergrößerung. Dabei wurden die Fluoreszenzsignale von Kontrollen, Rauch-exponierten und Rauch-exponierten mit Tergurid-behandelten Mäusen verglichen. Diese Färbung diente lediglich zur visuellen Lokalisierung und Expression von 3-Nitrotyrosin (nicht-proteinogene Aminosäure) im Lungengewebe. Diese Methode kann jedoch nicht als quantitativ erachtet werden.

3.2.4 Zellkultur

Die Isolation und Kultivierung der Endothel- und Epithelzellen erfolgte wie bereits in vorherigen Studien beschrieben [221].

3.2.4.1 Isolierung und Kultivierung von Maus-Endothelzellen

Die Endothelzellen (EC) wurden aus Lungen von Wildtyp-Mäusen isoliert. Anschliessend wurden Gewebeschnitte von ~ 1 mm in Hanks' balanced salt solution (HBSS) gewaschen, um das restliche Blut zu entfernen. Das zerkleinerte Lungengewebe wurde nun in sterile 50 ml Röhrchen überführt und mit 20 ml HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) mit Dispase (1 U/ml) für 60 min bei 37 °C verdaut. Das restliche Gewebe wurde über ein 70 µm Siebfilter (BD Falcon Cell Strainer 352350) entfernt. Danach wurde die Suspension bei 290 g zentrifugiert und die Zellen mit 5 ml HBSS + 0,5 %igem Rinderserumalbumin (BSA) gewaschen. Folgend wurden die Zellen mit 800 µl HBSS/BSA und 25 µl (4×10^5 Beads/µl) Dynabeads M-450 (Sheep anti-rat IgG, Invitrogen) - beschichtet mit 1,5 µg in Ratte produzierten Anti-Mouse CD144 Antikörper (BD Pharmingen) - resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation wurden ungebundenen Zellen durch 5maliges Waschen mit HBSS/BSA unter Verwendung einer magnetischen Vorrichtung (Dyna MPC-1; Invitrogen) entfernt. Anschliessend wurden die Zellen auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert und in einem Endothelzell-Wachstums-Medium (*low serum endothelial cell growth medium*; C-22020,

Promocell Heidelberg, Deutschland), ergänzt mit 15 %igem fötalem Kälberserum, kultiviert. Eine Konfluenz der Endothelzellen wurde nach ca. 7-10 Tage erreicht. Danach wurden die Zellen erneut mit HBSS/BSA gewaschen und durch Zugabe von CD144-beschichteten Dynabeads M-450 in HBSS/BSA für 60 min aufgereinigt. Nach Trypsinierung wurden die ungebundenen Zellen, wie beschrieben, entfernt. Die Reinheit der Endothelzellen wurde durch eine Färbung mit einem Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor (# 1284924; Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) bestätigt.

3.2.4.2 Isolierung und Kultivierung von murinen Alveolarepithel-Zellen Typ II (AEC II)

Primäre AECII Zellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert. Hierzu wurden die Lungen zweimal mit 1 ml sterilem PBS lavagiert, das Gewebe mit Dispase verdaut und anschließend zerkleinert. Die Suspension wurde nun sequentiell durch 100 µm, 20 µm und 10 µm Nylogewebe filtriert und bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Pellet in DMEM resuspendiert. Folgend wurde eine negative Selektion für Lymphozyten/Makrophagen durch Inkubation auf CD16/32- und CD45-beschichteten Petrischalen für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Eine negative Selektion für Fibroblasten wurde durch ein 45 minütiges Anhaften auf Zellkulturschalen erreicht. Direkt nach der Isolierung der AECII-Zellen wurden die Reinheit und die Lebensfähigkeit der Zellen bestimmt. Die Reinheit der Zellen wurde anhand der Epithelzellmorphologie und einer Immunofluoreszenzfärbung mit Antikörpern spezifisch für pro-SPC (positiv) und Antikörpern für α -SMA und CD45 (beide negativ) nach der Zytozentrifugation von AECII-Zellen überprüft. Die Zelllebensfähigkeit wurde mit Hilfe eines Trypan-Blau-Ausschlusses bestimmt. Zum Schluss wurden die AECII-Zellen in DMEM mit 10 %igem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und mit 100 g/ml Streptomycin suspendiert und für 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen phänotypisch charakterisiert. Nach einem Mediumwechsel konnten die Zellen für maximal 2 Tage in einem Wärmeschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert werden.

3.2.4.3 Messung der Proliferation

Zur Bestimmung der Proliferation der Endothel- und AECII-Zellen wurde ein ³H-Thymidin-Proliferationsassay gewählt. Bei diesem Assay wird während der Zellteilung ³H-Thymidin in die DNA inkorporiert, so dass es zur Markierung der neu synthetisierten DNA-Stränge

kommt. Im Anschluss erfolgte eine Messung der Inkorporation des radioaktiv markierten Thymidins. Die Endothel- und AECII-Zellen wurden, wie bereits beschrieben, kultiviert bis sie konfluent waren. Danach wurden die Zellen für 24 h auf ein null-Medium gesetzt [1% (v/v) FCS, 1% (m/v) P/S in M199 (Gibco, Karlsruhe)] und ausgehungert. Anschließend wurden die Zellen mit Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gewaschen und entweder Tergurid (1 nM, 1 μ M, 10 μ M), Serotonin (1 μ M) oder Tergurid in Kombination mit Serotonin appliziert und für 24 h inkubiert. Kaliumhydroxid (Merck, Darmstadt, Germany) diente als Kontrolle. Anschließend wurde den Zellen normales Medium mit Serum und 3 H-Thymidin (Amersham, München, Deutschland) zugesetzt und in einem Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4 h inkubiert. Es folgte ein Abernten der Zellen mit anschließender Messung der 3 H-Thymidin-Inkorporation mittels eines Szintillationszählers [Packard Bioscience (jetzt PerkinElmer); Meriden, USA].

3.2.4.4 Messung der Apoptoserate

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde das CaspACE Assay System Colorimetric (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Durchführung des Protokolls entsprach dabei den Instruktionen des Herstellers. Tergurid (1 nM, 1 μ M und 10 μ M), Serotonin (1 μ M) oder eine Kombination der beiden Substanzen wurde eine halbe Stunde vor der Messung in das Medium appliziert. Als Positivkontrolle wurde 1 μ M Staurosporin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 4 h eingesetzt.

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1 Laser-Mikrodissektion

Um die RNA-Expression spezifisch in intrapulmonalen Gefäßen und Septen von den behandelten und Rauch-exponierten Mäusen zu analysieren, wurde Mikrodissektion an Tissue-Tek[®]-eingebetteten Lungen durchgeführt (Sakura Finetek, Staufen). Anhand eines Kryostats (Leica) wurden 10 μ m dünne Schnitte angefertigt und auf mit RNaseZap (Sigma-Aldrich, Steinheim) gereinigten Membran Objektträgern (Katalog-Nr.: 11505158, Microdissect GmbH, Herborn) übertragen. Anschliessend wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll gefärbt:

- Hämalun (Waldeck, Münster) für 45 Sekunden
- je 2-maliges Eintauchen
 - in destilliertem Wasser

- in 70 %igem Ethanol
- in 90 %igem Ethanol
- in 99,6 %igem Ethanol

Nach einem kurzen Lufttrocknen der gefärbten Schnitte auf den Membran-Objektträgern wurden die intrapulmonalen Gefäße und die Septen mit Hilfe eines Laser-Mikrodissektions-Systems (LMD 6000; Leica, Wetzlar) isoliert und in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße, gefüllt mit 300 µl RNA-Lyse-Puffer (RLT-Puffer, Qiagen, Hilden), gesammelt. Durch Vortexen wurde das Material vermischt, kurz zentrifugiert und in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung gelagert.

3.2.5.2 RNA-Expressions-Untersuchungen

3.2.5.2.1 Aufreinigung von RNA aus Lungengewebe und mikrodissektiertem Material

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebehomogenat von Maus- und Human-Lungengewebe oder von mikrodissektiertem Material wurde mittels RNeasy Mikro- bzw. Mini-Kits (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, wobei eine zusätzliche DNase-Behandlung (DNase Set, Qiagen, Hilden) enthalten war. Das Lungengewebe wurde direkt nach Entnahme aus dem Stickstoff in 2 ml Schraubverschluss-Gefäße (Mikro-Schraubröhre, Sarstedt, Nümbrecht), mit 600 µl RLT-Lysepuffer (Qiagen, Hilden) und ca. 20 Keramikkügelchen (Ø 1,4 mm, Peqlab, Erlangen) überführt und für 30 Sekunden in einem Homogenisator (Precellys 24, Peqlab, Erlangen) homogenisiert. Anschließend wurde die entstandene Gewebesuspension für 10 Minuten bei 9503 g (10000 rpm) in einer Mikrozentrifuge 200 (Hettich, Tuttlingen) bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment mit den Zelltrümmern wurde verworfen und der Überstand mit der gelösten RNA weiter, nach Protokoll, verwendet. Die RNA aus mikrodissektierten intrapulmonalen Gefäßen oder Septen wurde mit dem iScript cDNA-Synthese Kit (Bio-Rad, München) nach Protokoll des Herstellers umgeschrieben. Im Anschluss an die Isolation wurden die RNA-Konzentrationen spektrometrisch mittels NanoDrop (ND-1000, Kisker-Biotech, Steinfurt) gemessen. Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA automatisch bestimmt, indem die Absorption der Wellenlängen bei 260 nm und 280 nm ins Verhältnis gesetzt wurden. Das Absorptionsmaximum von reinen Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, während kontaminierte Nukleinsäuren, durch Phenolreste und Proteine, ein Absorptionmaximum bei 280 nm aufweisen. Der Quotient bei reinen Isolaten liegt bei 1,8 (für DNA) bzw. 2,0 (bei RNA), wobei dieser bei einer Kontamination geringer ist.

3.2.5.2.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

Die Umschreibung von RNA zu komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erfolgte durch die Methodik der reversen Transkription [222] mit Hilfe des iScript cDNA-Synthese Kits (Bio-Rad, München), welche ein Nachweis und eine Quantifizierung von kleinsten RNA-Mengen ermöglicht. Es wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Ansätze wurden nach Angaben des Protokolls pipettiert und in einen Thermocycler unter folgenden Bedingungen umgeschrieben:

- 1 Zyklus bei 25 °C für 5 Minuten
- 1 Zyklus bei 42 °C für 30 Minuten
- 1 Zyklus bei 85 °C für 5 Minuten

Die entstandene cDNA wurde bis zur Verwendung bei der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktionen (qRT-PCR) bei -20 °C gelagert.

3.2.5.2.3 Quantitative Real-Time PCR

Um eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression (Genexpressionsanalyse) zu ermitteln, wurde die Methode der quantitativen Real-Time PCR verwendet. In dieser Arbeit wurde die Genregulation von a) Rauch-exponierten Mäusen zu Kontroll-Mäusen oder zu behandelten Mäusen, sowie von b) COPD-Patienten zu Donoren, verglichen. Das Prinzip der Real-Time PCR beruht auf einer Amplifizierung von DNA, die durch eine Fluoreszenz-Messung quantifiziert wird [222]. Die Fluoreszenz entsteht durch eine Interkalation des verwendeten Farbstoffs SYBR[®] Green I in doppelsträngige DNA, die mengenmäßig mit jedem Zyklus zunimmt. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenz durch eine Anlagerung an die DNA proportional mit der Zunahme doppelsträngiger DNA-Moleküle ansteigt [222]. Am Ende des qRT-PCR-Laufes wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion und die Gegenwart von Primer-Dimeren oder Verunreinigungen zu überprüfen. Hierbei wurde durch eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von 55 °C bis 95 °C die doppelsträngige DNA zu einem Einzelstrang aufgeschmolzen und der SYBR[®] Green I-Farbstoff wieder freigesetzt. Da spezifische PCR-Produkte eine größere Fragmentlänge aufweisen als unspezifische Primer-Dimere oder andere unspezifische Produkte, können diese anhand der Schmelztemperatur voneinander unterschieden werden. Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte mit dem Mx3000P[®] QPCR System der Firma Stratagene und dem iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München) nach Angaben des

Herstellers. Die Ansätze hatten ein Endvolumen von 25,0 µl und setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3.20: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion

Von den Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primern wurden je 10 pmol/µl eingesetzt. Die cDNA [komplementäre (complementary) DNA] galt als Template und wurde 1/5 verdünnt.

Substanz	Volumen (µl)
iQ SYBR Green Supermix	12,5
Vorwärts-Primer	0,5
Rückwärts-Primer	0,5
steriles Wasser	9,5
cDNA	2

Um Kontaminationen auszuschliessen, wurde bei jedem Lauf eine *non-template*-Kontrolle (ohne cDNA; Negativ-Kontrolle) für jeden Mastermix durchgeführt. Im Folgenden sind die Bedingungen eines Reaktionsansatzes aufgeführt:

Tabelle 3.21: Temperaturprofil der Real-Time PCR.

Abschnitt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Enzymaktivierung/ Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	10 sec	40
Primer- Anlagerung (Annealing)	59 °C	10 sec	40
Elongation	72 °C	10 sec	40
Denaturierung	95 °C	1 min	
Schmelzkurve	55 °C - 95 °C		
Abkühlen	25 °C	∞	

Die *cycle threshold*-Werte (Ct-Werte) wurden zum Referenz-Gen Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) normalisiert. Das Referenz-Gen wurde ausgewählt, da es in Rauch-exponierten Mauskungen und im Lungengewebe von COPD-Patienten im Vergleich zu nicht-exponierten Individuen nicht reguliert wurde. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch folgende Formel:

$$\Delta Ct = Ct \text{ (PBGD)} - Ct \text{ (untersuchtes Gen)}$$

3.2.5.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden nach der Real-Time PCR die PCR-Produkte in einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt [222]. Dazu dienten 1,6 %ige Gele aus Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1 x Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TAE-Puffer: Tris-Acetate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6). In einer Mikrowelle wurde die Agarose aufgeköcht und anschliessend auf ca. 50-60 °C abgekühlt. Nach Versetzung der Gele mit 3 µl SYBR safe DNAgel stain (Invitrogen) wurden diese in einem abgedichteten Gelschlitten ausgegossen. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR safe legt sich als Interkalator zwischen die einzelnen Basenpaare des DNA-Stranges und macht diesen im UV-Bereich sichtbar. Als die Agarosegele erstarrt waren, wurde ein DNA-Standard (GeneRuler™ 100 bp Ladder, Fermentas) aufgetragen. Jeweils 12 µl Probe wurden mit 2 µl 6 x Loading Dye (Fermentas) vermischt und auf das Gel geladen. Nach dem Auftrennen der Produkte bei 120 Volt in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Laufpuffer wurden die Bandenmuster unter UV-Licht bei 320 nm mit dem Bio Imaging System (ChemiGenius, SynGene, Cambridge, UK) visualisiert.

3.2.5.3 Untersuchungen der Proteinexpression

3.2.5.3.1 Proteinaufreinigung aus Lungengewebe

Für die Extraktion der Proteine wurden ca. 150 mg Lungengewebe in 2 ml Schraubverschluss-Gefäße mit 400 µl kaltem Lysepuffer und ca. 20 Keramikkügelchen gegeben und für 2 x 30 Sekunden in einem Homogenisator (Precellys 24, Peqlab, Erlangen) homogenisiert.

Zusammensetzung des Lysepuffers:

- 1000 µl Ripa-Puffer
(50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 60 mM NaN₃, 1 %iges Triton X-100)
- 40 µl Complete (Proteinase-Inhibitor)
- 5 µl 200 mM Na-Orthovanadat
- 1 µl 100 mM PMSF

Nach der Homogenisierung wurden die Proben 5 Minuten bei 9.503 g (10000 rpm) und 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Ruhen der Proben für 15 Minuten auf Eis. Das entstandene Pellet aus Geweberesten wurde nun verworfen und der Überstand in 1,5 ml-Eppendorf-Tubes überführt. Danach wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Proteinlösung bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.5.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der homogenisierten Proben wurde mittels DC Protein Assay von Bio-Rad bestimmt und basiert auf dem Prinzip der Lowry-Methode. Bei diesem Nachweis kommt es zu einer Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und zweiwertigen Kupferionen (Biuretreaktion), was anhand einer Violettfärbung zu erkennen ist. Anschließend werden diese Kupfer(II)ionen zu Kupfer(I)ionen reduziert, welche darauffolgend das gelbliche Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdän reduzieren. Die daraus resultierende Blaufärbung wird für die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt [223]. Vor der Konzentrationsmessung wurden die Proben 1:10 mit Ripa-Puffer verdünnt. Als Referenz diente eine Standardreihe (von 0,2 mg/ml bis 1,6 mg/ml) aus boviner Serumalbumin (BSA)- Lösung von Bio-Rad und als Leerwert Ripa-Puffer. Es wurden jeweils 5 µl des Leerwertes, der Standards und der Proteinproben als Doppelansätze in 96-well Mikroplatten pipettiert. Anschließend wurde 25 µl Reagenz A' (entspricht 1 ml von Reagenz A mit 20 µl Reagenz S) und danach 200 µl Reagenz B in jedes Well gegeben. Die 96-well Platte wurde anhand eines Mikroplattenlesegeräts (Elx808, Bio Tek) zunächst unter Schütteln durchmischt und dann bei 750 nm Absorption gemessen. Eine Berechnung der Standardkurve und der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Standard-Software.

3.2.5.3.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Mittels der SDS-PAGE werden die einzelnen Proteine eines Proteingemisches nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt (diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese). Durch SDS (Natriumdodecylsulfat), einem anionischen Tensid (Detergens), werden die Eigenladungen von Proteinen überdeckt, sodass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. In Kombination mit einem kurzen Aufkochen der Proteinproben kommt es zu einer Linearisierung der Proteine durch Denaturierung. Die Komplexe wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode, so dass eine Auftrennung der denaturierten Proteine nach dem Molekulargewicht gewährleistet wird. Längere Proteine werden im Gel stärker zurückgehalten als kürzere Proteine [223]. Aufgrund der Größe der nachzuweisenden Proteine wurden 12 %ige-Gele verwendet. Jedes Gel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel und wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 3.22: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE

Die Angaben der Zusammensetzung beziehen sich auf die Herstellung von 10 ml pro Gel.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
Aqua dest.	5,7 ml	3,4 ml
30 % Acrylamid	1,7 ml	4,0 ml
Tris-Puffer*	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

*Tris-Puffer: Trenngel: 1,5 mol Tris pH 8,8; Sammelgel: 0,5 mol Tris pH 6,8

Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden zugesetzt, um die Polymerisationsreaktion zu katalysieren. Alle Proben wurden zuvor durch Zugabe von Ripa-Puffer auf eine gleiche Proteinkonzentration angeglichen. Danach wurde den Proben 4fach konzentriertes NuPage LDS Ladepuffer zugefügt und mit 2,6 µl β-Mercaptoethanol pro 100 µl Volumen (Aufspalten der Disulfidbrücken) versetzt. Anschließend wurden die Proben auf einem Thermoblock (VWR, Bruchsal) für 10 Minuten bei 99 °C erhitzt und kurz zentrifugiert, um kondensierte Probenbestandteile wieder in Lösung zu bringen. Die Proben wurden nun auf das Gel aufgetragen und durch Elektrophorese (100 V, 400 mA, 150 W, 90 Min) in Laufpuffer (Lämmli-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 %igem SDS) aufgetrennt. Es wurden 40 µg/µl Gesamt-Protein für den Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 50 µg/µl Gesamt-Protein für den Nachweis von Serotoninrezeptoren (5-HT_{2A/2B}) und Serotonintransportern (5-HTT) eingesetzt. Als Proteinstandard wurden 4 µl eines Markers (Precision Plus Protein TM Standard, Bio-Rad) aufgetragen.

3.2.5.3.4 Western Blot

Der Western Blot oder Immunoblot ist eine Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern [223]. Hierfür wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran (Pall Corporation, Dreieich) unter Anwendung eines Semidry-Blot-Systems der Firma Keutz transferiert. Vor Beginn des Blots wurden zunächst PVDF-Membran und sechs Whatman-Filter auf 8,5 x 5,5 cm Größe zugeschnitten. Die Membran wurde für eine Sekunde in Methanol aktiviert und anschließend mit den Whatman-Filtern in Transferpuffer (2,9 g Glycin, 5,8 g Tris, 1,85 ml 20

%iges SDS, 200 ml Methanol, mit A. dest auf 1 Liter aufgefüllt) eingelegt. Dann wurde der Blot in der Reihenfolge 3 x Filter – Membran – Gel – 3 x Filter sandwichartig zusammen gebaut. Negativ geladene Proteine wanderten im elektrischen Feld von Minus-zum Pluspool. Nach dem Transfer (75 Minuten, 100 V, 115 mA, 150 W) wurde die Membran in 6 % (w/v) Milchpuffer (SkimMilk-Pulver gelöst in TBST) für eine Stunde geblockt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Danach erfolgte über Nacht die Inkubation im Primärantikörper (gelöst in 6% (w/v) Milchpuffer). Am Folgetag wurde die Membran 3 x 10 Minuten in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen und danach für eine Stunde im Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (gelöst in 6 % (w/v) Milchpuffer) inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBST (3-5 x für 10 Minuten) wurde die Membran mit dem Peroxidase-Substrat ECL Plus (1ml Lösung A + 25 µl Lösung B pro Membran) von GE Healthcare (München) für 5 Minuten inkubiert. Eine Reaktion der Peroxidase mit dem ECL Plus Substrat führte zu einer Chemilumineszenz auf der Membran, die auf Chemilumineszenz-Filme (Cronex 5 Medical X-Ray Film, Agfa, Mortsel, Belgien) übertragen (je nach Bedarf 1-15 min) und mit Hilfe einer Entwicklermaschine (Curix, Agfa, Mortsel, Belgien) sichtbar wurde. Zur Auswertung wurde der Film mit dem Bio-Imaging System fotografiert und die Banden mit der Gene-Tools-Software densitometrisch quantifiziert.

Im Falle eines erneuten Inkubierens der Membran mit einem anderen Antikörper (z.B. β -Aktin) musste diese zunächst „gestrippt“ werden. Hierbei wurden die gebundenen Antikörper durch eine einstündige Inkubation in einem Stripping-Puffer (90 ml Aqua dest., 10 ml 1 M Glycin, 1-2 ml HCl 37 %) entfernt. Danach wurde die Membran 3 x 10 min in TBST gewaschen und wieder für 1 h in 6 % Milchpuffer geblockt. Anschließend konnte die Membran nach obigem Protokoll erneut mit einem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und entwickelt werden.

3.2.6 Serotonin-ELISA von Plasmaproben

Die quantitative Bestimmung der Serotoninkonzentration im Plasma von Rauch-exponierten mit Tergurid- oder Placebo-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen wurde mit Hilfe eines ultra-sensitiven Enzym Immunassays (Serotonin Research ELISA Kit, BAE-5900, Labor Diagnostika NORD GmbH & Co. Kg) durchgeführt. Das Prinzip dieses ELISAs wird folgend beschrieben. Zunächst wird Serotonin quantitativ acyliert. Der Serotonin-ELISA nutzt das Prinzip des kompetitiven Immunassays [223]. Das Antigen ist an der Mikrotiterplatte gebunden. Die acylierten Standards, Kontrollen oder Proben und das an der Festphase

gebundene Analyt konkurrieren nun um eine Bindestelle am Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden freie Antigen und Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird anhand eines Peroxidase-konjugierten Anti-Rabbit-IgG mit TMB als Substrat detektiert. Durch photometrische Messung bei 450 nm kann die Serotoninmenge quantifiziert werden. Die Farbintensität ist dabei antiproportional zu der Menge an Serotonin. Eine Quantifizierung der unbekannten Proben wird durch den Vergleich der Extinktion mit einer Referenzkurve erreicht. Die Plasmaproben wurden 1:1000 verdünnt. Alle Proben wurden in Doppelansätzen aufgetragen. Der Serotonin-ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Durchführung des ELISAs wurden die Platten mit einer Wellenlänge von 450 nm in einem Mikroplattenlesegerät (Molekular Devices Versamax Microplatereader, MDS Analytical Technologies) ausgelesen.

Anschließend wurden in Excel die Doppelansätze gemittelt. Mit Hilfe der Standardreihe wurde eine Eichgerade nach der Geradengleichung $y = mx + b$ bestimmt. Hierbei wurde die gemessene Absorbance (bei 450 nm) der Standardproben (y-Achse) gegen die logarithmierten Serotoninkonzentration (ng/ml) der Standardproben (x-Achse) aufgetragen. Anschliessend wurde die Steigung „m“ und danach der Achsenabschnitt „b“ berechnet. Die gemessene Extinktion der Proben konnte so in die Geradengleichung eingesetzt und die logarithmierte Serotoninkonzentration errechnet werden. Mit Hilfe der Umkehrfunktion wurde dann die reelle Serotoninkonzentration angegeben.

3.2.7 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde die Graph Pad Prism 5 Software verwendet. Da Graph Pad Prism ein internationales Programm ist, wurde bei allen Achsenbeschriftungen ein Komma durch einen Punkt ersetzt. Alle Daten wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM = *standard error of mean*) angegeben. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen miteinander wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet. Bei einer statistischen Analyse mehrerer Gruppen untereinander wurde eine ANOVA (Varianzanalyse) mit anschließendem Student-Newman-Keuls post-hoc Test durchgeführt. Alle Werte mit einem p-Wert von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und sind mit * (für $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$) gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Expressions-Analysen der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) bei COPD-Patienten GOLD-IV

Die vorliegende Arbeit untersucht die Hypothese, dass Serotoninrezeptoren und Serotonintransporter in der Entwicklung der Zigarettenrauch-induzierten COPD eine Rolle spielen. Daher wurde zuerst die Gen-Expression von 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} und 5-HTT im Lungenhomogenat von Lungen gesunder Donoren und COPD-Patienten (GOLD-IV Endstadium) untersucht, welche im Rahmen von Lungentransplantationen gewonnen wurden. Abbildung 4.1 zeigt, dass die Expression der beiden Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} im Lungenhomogenat von COPD-Patienten signifikant im Vergleich zu den gesunden Donoren hochreguliert waren. Eine veränderte Gen-Regulation des Serotonintransporters 5-HTT konnte nicht aufgezeigt werden.



Abbildung 4.1: mRNA-Expression von 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von gesunden Donoren und COPD-Patienten

Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpressionen der Serotoninrezeptoren (5-HTR_{2A/2B}) und des Serotonintransporters (5-HTT) in humanem Lungenhomogenat von gesunden Donoren und COPD-Patienten (GOLD-IV). Die delta Ct-Werte wurden zum Referenz-Gen PBGD normalisiert, n = 4-5. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Donoren und COPD-Patienten (*: p< 0,05; **: p< 0,01).

Eine mRNA-Expression gewährt in den meisten Fällen Auskunft auf die darauf folgende Protein-Expression, jedoch resultiert eine Erhöhung der mRNA-Expression nicht immer in einer Erhöhung der Protein-Menge. Das Protein stellt die funktionelle Einheit dar, so dass nun

die Protein-Expression der Serotoninrezeptoren und des Serotonintransporters im Lungenhomogenat von gesunden Donoren und in COPD-Patienten (GOLD-IV) überprüft wurde. Aus Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2 geht hervor, dass in diesem Fall die erhöhte mRNA-Expression mit der Protein-Expression von 5-HTR_{2A} (Abbildung 4.2a) und 5-HTR_{2B} (Abbildung 4.2b) übereinstimmt. Es wurde für beide Serotoninrezeptoren eine signifikant gesteigerte Protein-Expression im Vergleich zu den gesunden Donoren festgestellt. Analog zur mRNA-Expression des 5-HTT fand sich auch auf Proteinebene keine veränderte Expression (Abbildung 4.2c).

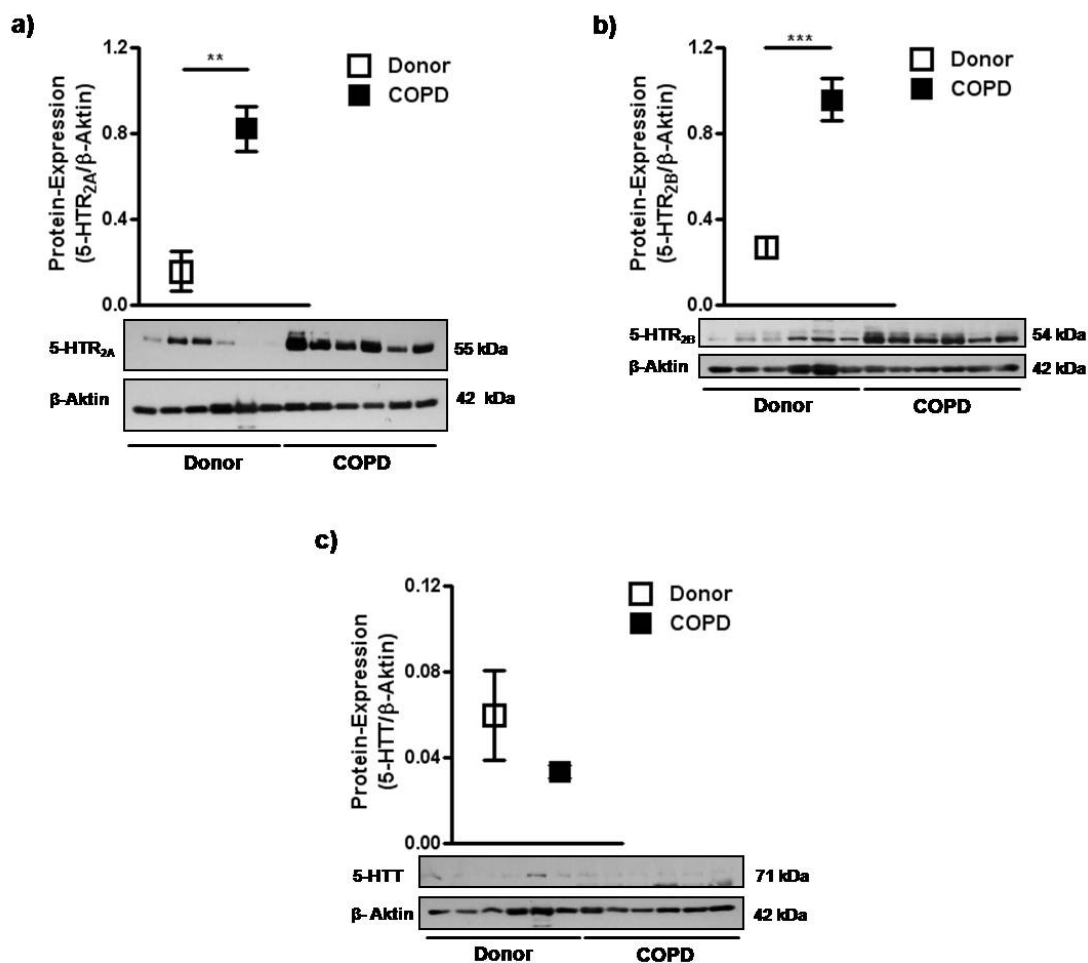


Abbildung 4.2: Protein-Expression von 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von gesunden Donoren und COPD-Patienten

Western Blot Analysen zur Bestimmung der Protein-Expression von (a) 5-HTR_{2A}, (b) 5-HTR_{2B} und (c) 5-HTT aus Lungenhomogenat gesunder Donoren und COPD-Patienten (GOLD-IV). Normalisiert zum Referenz-Protein β-Aktin. Die densitometrische Auswertung wird jeweils im oberen Teil und ein repräsentativer Western Blot im unteren Teil der Abbildung gezeigt, n= 4-6. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Donoren und COPD-Patienten (**: p< 0,01;***: p< 0,001).

4.2 Expressions-Analysen der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) während der Rauch-induzierten Emphysem-Entwicklung in Wildtyp (Wt)-Mäusen

Um zu überprüfen, ob die Expressionen der Serotoninrezeptoren und des Serotonintransporters in humanen COPD-Lungen mit der Expression in den Mauslungen des Rauch-induzierten Emphysemmodells vergleichbar ist, wurde ebenfalls die Genexpression im Lungenhomogenat von 3- und 8-Monate Rauch-exponierten Mäusen untersucht. Vorherige Studien konnten zeigen, dass die Ergebnisse am besten mit 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen zu vergleichen sind, da diese in Anbetracht des Emphysems und des pulmonalen *Remodelings* einem COPD-Patienten im Endstadium (GOLD-IV) sehr ähnlich sind [221]. Mäuse des Rauch-induzierten Modells entwickeln jedoch nur milde strukturelle und mechanische Veränderungen in der Lunge, welche mit dem GOLD-II-Stadium vergleichbar sind. Mäuse haben z.B. keine spontanen Exazerbationen, welche zu den Hauptmerkmalen der COPD-Patienten in GOLD-III und IV gehören [224, 225]. Aus Abbildung 4.3a geht hervor, dass 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} nach 3-monatiger Rauch-Exposition keine veränderte Gen-Regulation aufwiesen. Abbildung 4.3b zeigt hingegen eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression von 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} nach 8-monatiger Rauch-Exposition im Vergleich zu den nicht-exponierten Mäusen. Eine veränderte Gen-Regulation des 5-HTT fand sich nicht.

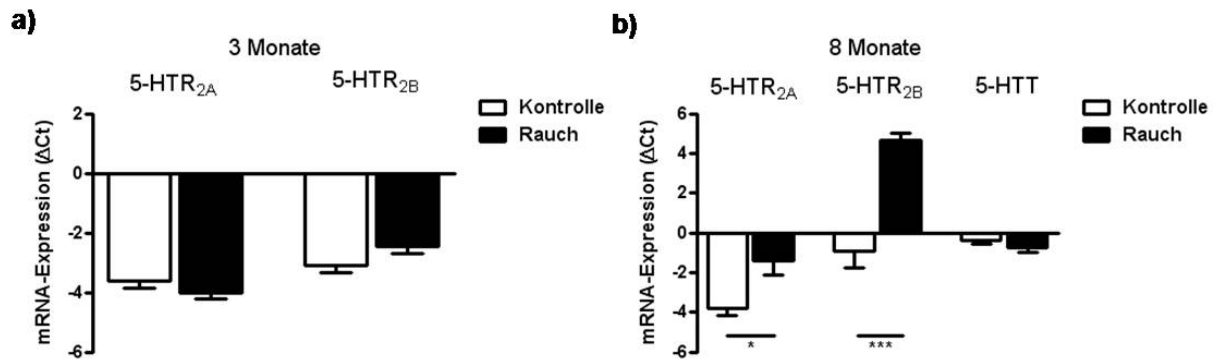


Abbildung 4.3: mRNA-Expression von 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von Kontrollen und 3- bzw. 8-monatigen Rauch-exponierten Wt-Mäusen

Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpressionen der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) in Maus-Lungenhomogenat von **(a)** Kontrollen im Vergleich zu 3-monatiger Rauch-Exposition, n = 4-8 und **(b)** Kontrollen im Vergleich zu 8-monatiger Rauch-Exposition, n = 5-7. Die delta Ct-Werte wurden zum Referenz-Gen PBGD normalisiert. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen nicht-Rauch-exponierten Mäusen (Kontrollen) und Rauch-exponierten Mäusen (Rauch) (*: p< 0,05; ***: p< 0,001).

Weiterhin wurde im Modell zur Rauch-induzierten Emphysementwicklung in Mäusen überprüft, ob die mRNA-Expression mit der Protein-Expression korreliert. Identisch zur mRNA-Expression konnte keine veränderte Protein-Expression der beiden Serotoninrezeptoren (Abbildung 4.4a, b) und des Serotonintransporters (Abbildung 4.4c) nach 3-monatiger Rauch-Exposition nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Erhöhung des 5-HTR_{2A} (Abbildung 4.4a) und des 5-HTR_{2B} (Abbildung 4.4b) im Lungenhomogenat von 8-Monate Rauch-exponierten Mäuse festgestellt werden. Auch nach 8-monatiger Rauch-Exposition kam es zu keiner veränderten Regulation des 5-HTT (Abbildung 4.4c).

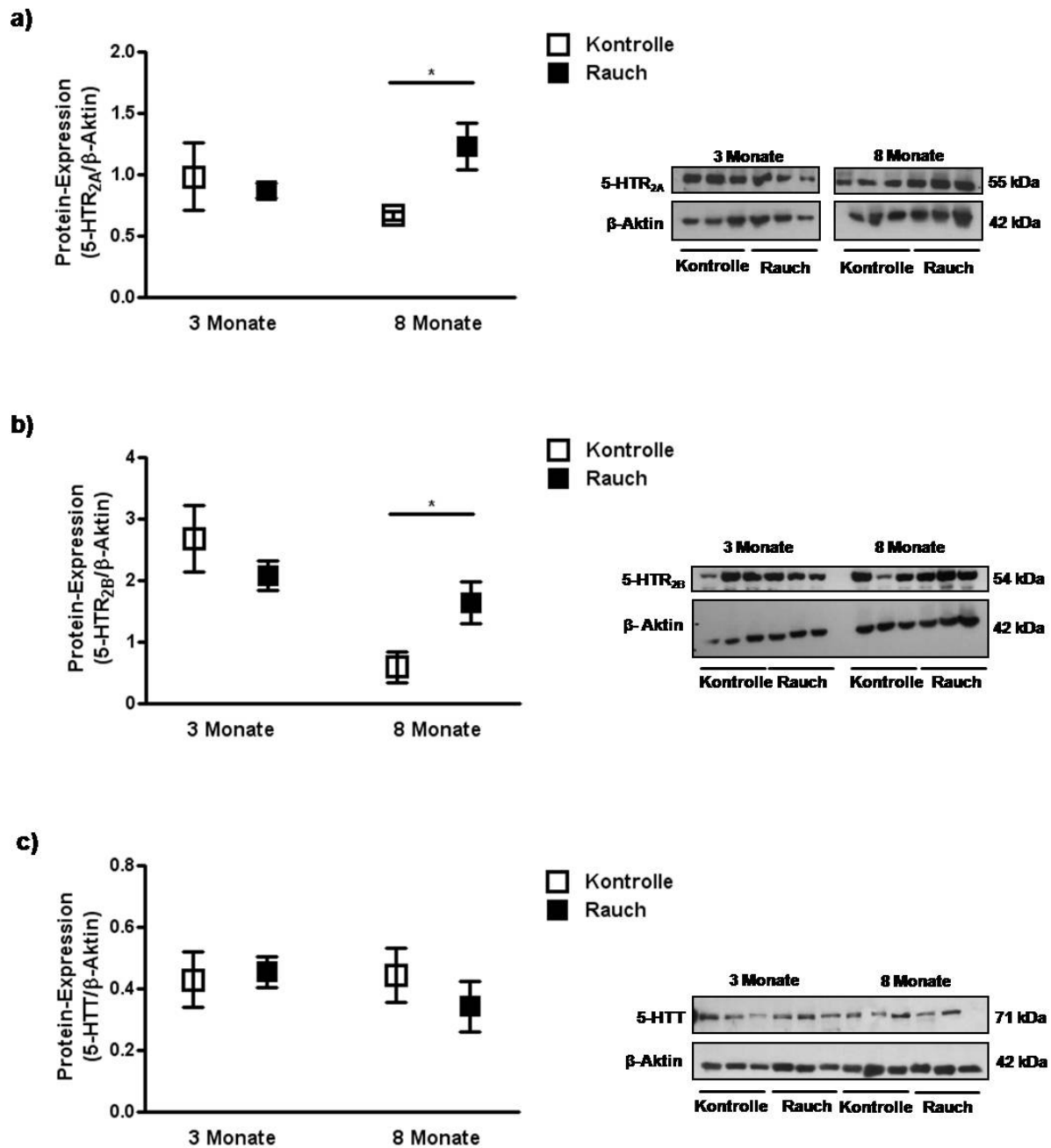


Abbildung 4.4: Protein-Expression von 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von Kontrollen und 3- bzw. 8-monatigen Rauch-exponierten Wt-Mäusen

Western Blot-Analysen zur Bestimmung der Protein-Expression von (a) 5-HTR_{2A}, (b) 5-HTR_{2B} und (c) 5-HTT aus Lungenhomogenat von nicht-Rauch-exponierten (Kontrollen) und Rauch-exponierten Mäusen. Normalisiert wurde zum Referenz-Protein β-Aktin. Dargestellt ist jeweils die densitometrische Auswertung (links) und ein repräsentatives Bild (rechts) der Western Blot-Analysen, n = 3-5. * = Signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen Kontrollen und Rauch-exponierten Mäusen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Rauch die Expression der Serotoninrezeptoren sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene beeinflusst und dass eine Vergleichbarkeit zwischen den Analysen der humanen Daten mit den Mausdaten besteht.

Basierend auf diese Beobachtungen wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass der Serotonin-Signalweg an der Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems und der pulmonalen Hypertonie beteiligt ist und somit eine therapeutische Beeinflussung dieses Signalwegs eine neue Strategie zur Behandlung der COPD darstellen könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im folgenden Teil der Arbeit Mäuse für 8 Monate Rauch-exponiert, wobei sie parallel im präventiven Ansatz mit dem 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} Inhibitor Tergurid behandelt wurden.

4.3 Überlebensrate und Veränderung des Körpergewichts während der präventiven Behandlung der Mäuse mit Tergurid oder Placebo im Rauch-induzierten Emphysemmodell

Während der Studie mit Tergurid wurden die Mäuse in 3 Gruppen, bestehend aus je 16 Tieren, aufgeteilt. Die Gruppen wurden wie folgt behandelt:

Gruppe 1 (Kontrollgruppe):

Die Mäuse dieser Gruppe wurden über den 8-monatigen Zeitraum bei Raumluft (21 % O₂) gehalten. Sie wurden zeitgleich zu den anderen Gruppen mit Placebo 2-mal täglich via Gavage behandelt.

Gruppe 2 (Rauch-exponierte Kontrollgruppe):

Die Mäuse dieser Gruppe wurden über einen Zeitraum von 8 Monaten 6 Stunden pro Tag und 5 Tage in der Woche Rauch-exponiert. Jeweils eine Stunde vor und nach der Rauch-Exposition erhielten die Mäuse Placebo via Gavage.

Gruppe 3 (Rauch-exponierte Therapiegruppe):

Die Mäuse dieser Gruppe wurden entsprechend der Gruppe 2 Rauch-exponiert. Ihnen wurde anstelle von Placebo die Wirksubstanz Tergurid in einer Dosierung von 1 mg/kg appliziert.

Im Verlauf der Studie verstarben keine Tiere (Abbildung 4.5). In keiner der Versuchsgruppen traten ersichtliche Nebenwirkungen auf. Alle Mäuse zeigten ein normales Allgemeinbefinden, eine normale Futter- und Wasseraufnahme, sowie ein physiologisches Putz- und Sozialverhalten.

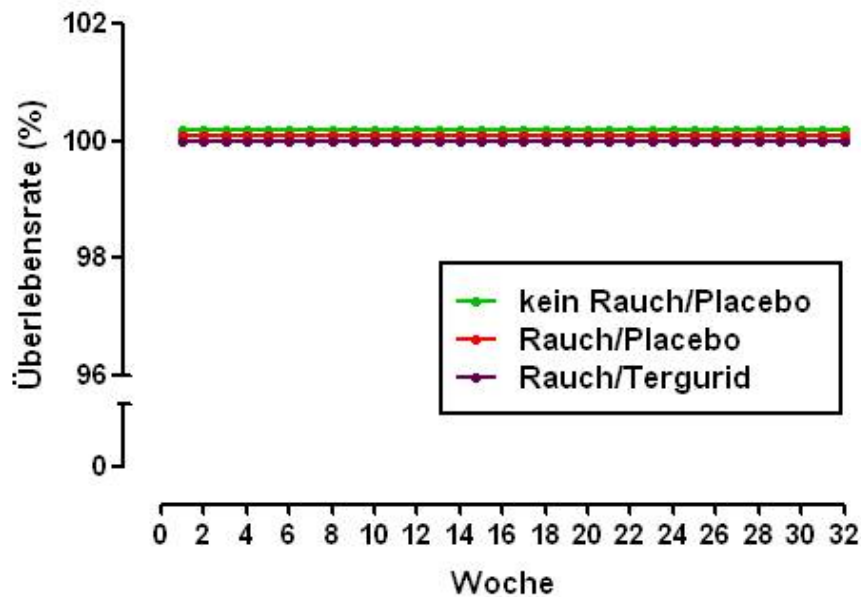


Abbildung 4.5: Darstellung der Überlebensrate der Mäuse während der präventiven Behandlung mit Tergurid

Die Überlebensrate wurde in Prozent (%) über den 8-monatigen Zeitraum (32 Wochen) der Rauch-Exposition dargestellt. Alle Mäuse wurden jeweils vor und nach der Rauch-Exposition entweder mit 1 mg/kg Körpergewicht (KG) Tergurid oder Placebo via Gavage behandelt. Die grüne Linie zeigt die nicht Rauch-exponierte Kontrollgruppe, die mit Placebo behandelt wurde (kein Rauch/Placebo), $n = 16$. Die rote Linie stellt die Rauch-exponierte Kontrollgruppe da, die mit Placebo behandelt wurde (Rauch/Placebo), $n = 16$. Die violette Linie zeigt die Rauch-exponierte Therapiegruppe unter Applikation von Tergurid (Rauch/Tergurid), $n = 16$.

Einmal pro Woche erfolgte eine Kontrolle des Gewichts aller Tiere. Abbildung 4.6 stellt die Veränderung des Körpergewichts während der gesamten Versuchsdauer dar. Da die Ausgangsgewichte zu Versuchsbeginn variierten, wurde die Gewichtsveränderung in Prozent angegeben. Ab der 7. Woche nahm die Placebo-behandelte Rauch-exponierte Gruppe im Vergleich zu den Tieren der Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollgruppe im Mittel signifikant ab bzw. weniger an Gewicht zu. Eine signifikant höheres Gewichts der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäuse im Vergleich zu Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse wurde in der 6., 8., 12., 20. und 22. Woche beobachtet. Am Ende des Versuches stieg das Gewicht der Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Mäuse durchschnittlich um $31,9 \% \pm 2,2 \%$, die Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse um

18,8 % \pm 2,3 % und die Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäuse um 23,6 % \pm 1,9 % verglichen zu ihrem Ausgangsgewicht an.

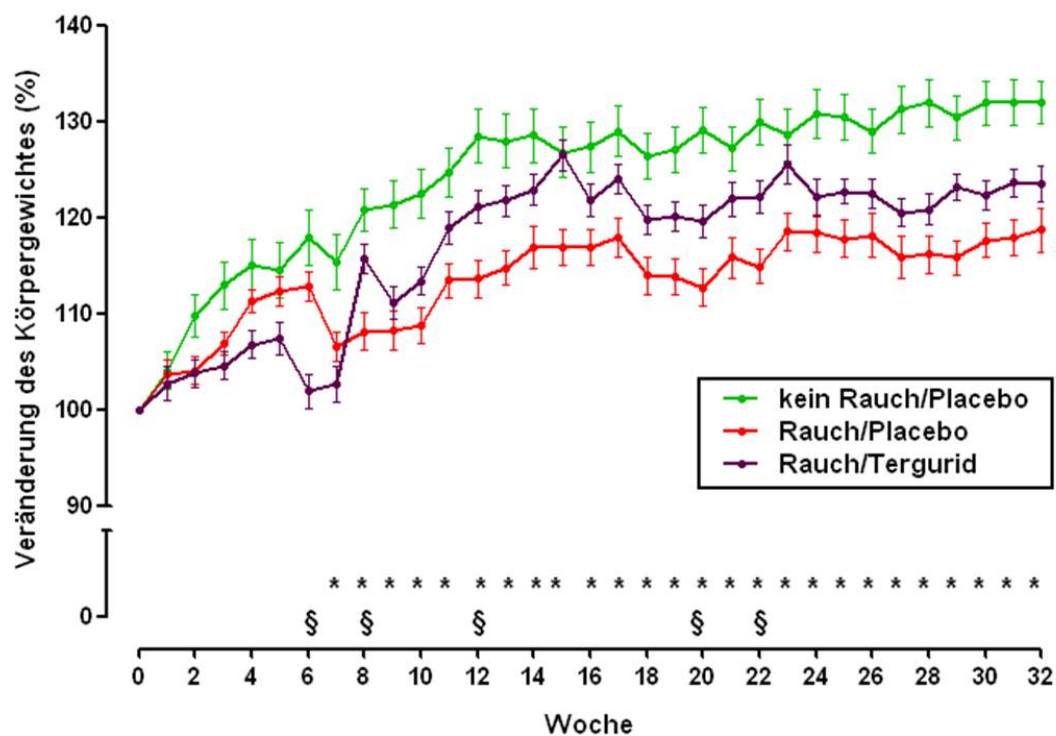


Abbildung 4.6: Darstellung der Veränderung des Körpergewichts der Mäuse während der präventiven Behandlung mit Tergurid

Der Verlauf des Körpergewichts wurde in Prozent (%) über den 8-monatigen Zeitraum (32 Wochen) der Rauch-Exposition dargestellt, ausgehend vom mittleren Anfangsgewicht (100 %). Alle Mäuse wurden jeweils vor und nach der Rauch-Exposition entweder mit 1 mg/kg Körpergewicht (KG) Tergurid oder Placebo via Gavage behandelt. Die grüne Linie zeigt die nicht Rauch-exponierte Kontrollgruppe, welche mit Placebo behandelt wurde (kein Rauch/Placebo), n = 16. Die rote Linie stellt die Placebo-behandelte Rauch-exponierte Kontrollgruppe dar (Rauch/Placebo), n = 16. Die violette Linie zeigt die Rauch-exponierte Therapiegruppe unter Applikation von Tergurid (Rauch/Tergurid), n = 16. * = signifikanter Unterschied zwischen den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollgruppe und der Rauch-exponierten Kontrollgruppe ($p < 0,05$); § = signifikanter Unterschied zwischen der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Kontrollgruppe und der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Therapiegruppe ($p < 0,05$).

4.4 Arterieller Sauerstoff-Partialdruck und Hämatokrit

Zur Charakterisierung der physiologischen Reaktion auf die Rauch-Exposition wurden am Versuchsende der arterielle Sauerstoff-Partialdruck und der Hämatokrit bestimmt. Aus Abbildung 4.7a geht hervor, dass sich der mittlere arterielle Sauerstoff-Partialdruck (pO_2) in den einzelnen Versuchsgruppen nicht signifikant unterschied. Abbildung 4.7b zeigt die mittleren Hämatokrit-Werte der einzelnen Versuchsgruppen nach Versuchende. Die Placebo-behandelte nicht Rauch-exponierte Kontrollgruppe wies einen Hämatokrit von $28,5 \% \pm 1,2 \%$ auf. In Bezug auf diese Gruppe war der Hämatokrit der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe signifikant erhöht. Im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen war der Hämatokrit der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen mit $34,4 \% \pm 1,1 \%$ deutlich geringer, sank jedoch nicht auf den Wert der nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäuse.

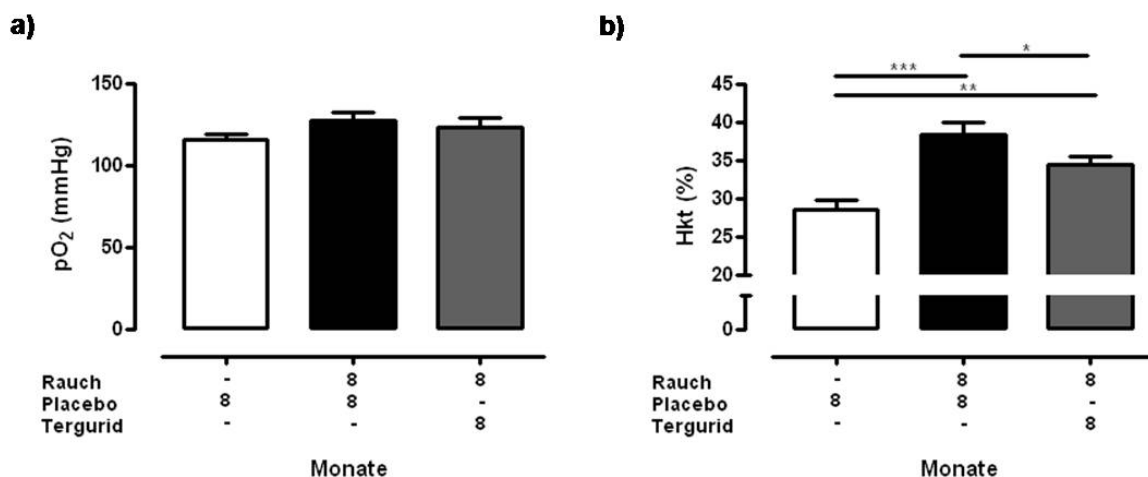


Abbildung 4.7: Darstellung des arteriellen Sauerstoff-Partialdruckes und des Hämatokritwertes nach präventiver Terguridbehandlung und 8-monatiger Rauch-Exposition

Alle Mäuse wurden jeweils vor und nach der Rauch-Exposition entweder mit 1 mg/kg Körpergewicht (KG) Tergurid oder Placebo via Gavage behandelt. Nach 8-monatiger Rauch-Exposition wurde **(a)** der arterielle Sauerstoff-Partialdruck, $n = 9-10$ und **(b)** der Hämatokrit, $n = 14-16$, gemessen. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$); Hkt = Hämatokrit.

4.5 Einfluss der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Entwicklung eines Lungenemphysems in Mäusen

Nach einer Zeitspanne von 8 Monaten wurden zunächst physiologische Messungen zur Charakterisierung der Lungenfunktion an den Mäusen der unterschiedlichen Versuchsgruppen durchgeführt. Dabei wurden die Lungen-Compliance und der pulmonale Widerstand (Resistance) gemessen. Die Compliance dient als Maß für die Dehnbarkeit der Lunge und wird zur Beschreibung und Quantifizierung der Elastizität einer Lunge verwendet [6, 9, 226]. Die Resistance beschreibt den Atemwegswiderstand und kann einen Hinweis für eine Atemwegsobstruktion geben [9, 227]. Hierbei ist hinzuzufügen, dass die Mäuse im verwendeten Rauch-induzierten Modell zur Entwicklung eines Emphysems keine dem COPD-Patienten äquivalente Atemwegsobstruktion ausbilden [225]. Der pulmonale Atemwegswiderstand der Maus verhält sich entgegengesetzt zu dem Widerstand eines Menschen. Diese Divergenz kann durch die Unterschiede der Luftwegsanatomie bei Mäusen in Kombination mit deutlich geringerer end- und expiratorischer Schließung der terminalen Atemwege erklärt werden [228, 229]. Eine Widerstandsabnahme bei einem Menschen deutet auf eine Reversibilität der Obstruktion hin.

Aus Abbildung 4.8a geht hervor, dass die Compliance in den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen und zu den mit Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen signifikant erhöht war. In Abbildung 4.8b ist zu erkennen, dass der pulmonale Widerstand der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse gegenüber den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen und den mit Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Tieren signifikant reduziert war.

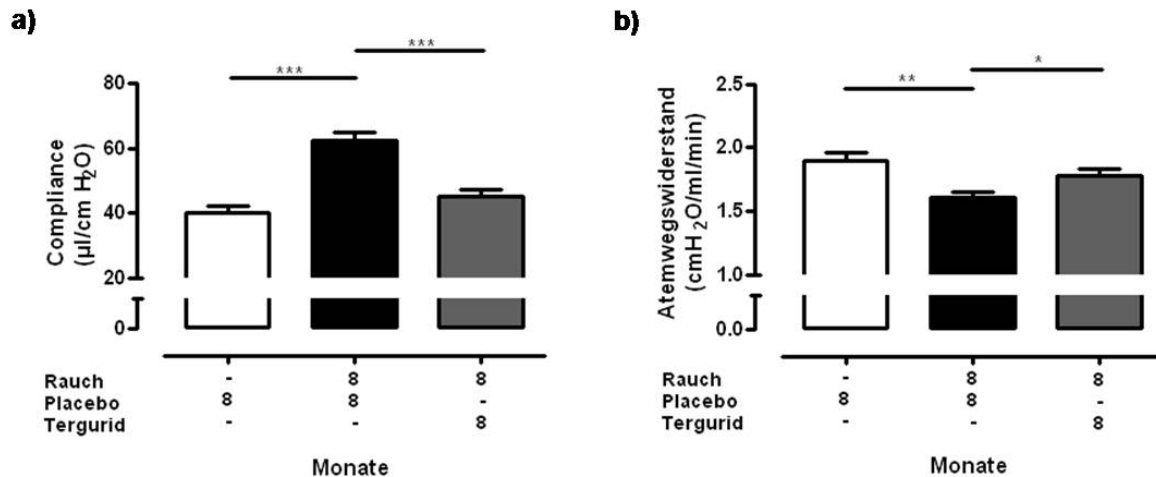


Abbildung 4.8: Darstellung des präventiven Einflusses von Tergurid auf die Lungenfunktion der Tiere nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Alle Mäuse wurden jeweils vor und nach der Rauch-Exposition entweder mit 1 mg/kg Körpergewicht (KG) Tergurid oder Placebo via Gavage behandelt. Nach 8-monatiger Rauch-Exposition wurde die Lungenfunktion der Tiere gemessen und folgende Parameter bestimmt: **(a)** die Compliance und **(b)** der Atemwegswiderstand. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$), je $n = 16$.

Um die physiologischen Erkenntnisse aus den Versuchen zur Bestimmung der Lungenfunktion der Tiere zu unterstützen und Aussagen über den Effekt von Tergurid auf die Emphysementwicklung machen zu können, wurde anschließend eine alveolarmorphometrische Analyse an Lungengewebschnitten der einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt. Dabei wurden drei Parameter bestimmt:

- 1) der prozentuale Gesamtluftraum auf alveolarer Ebene (*airspace*);
- 2) der mittlere Abstand zwischen Alveolarsepten (*mean linear intercept*, MLI)
- 3) die Septendicke (*septal wall thickness*).

Abbildung 4.9a zeigt, dass der prozentuale Gesamtluftraum der Alveolen in Lungenschnitten von Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Mäusen signifikant größer war. Eine präventive Behandlung mit Tergurid in Rauch-exponierten Mäusen bewirkte einen signifikant niedrigeren *airspace* im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen. Der mittlere Abstand zwischen den Alveolarsepten (Abbildung 4.9b) war in den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen gegenüber den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Mäusen

signifikant erhöht. Im Vergleich dazu konnte keine Veränderung in den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen festgestellt werden. Aus Abbildung 4.9c ist zu entnehmen, dass sich die Septendicke der Versuchsgruppen nicht unterschieden.

Repräsentative histologische Bilder zur alveolären Morphometrie sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

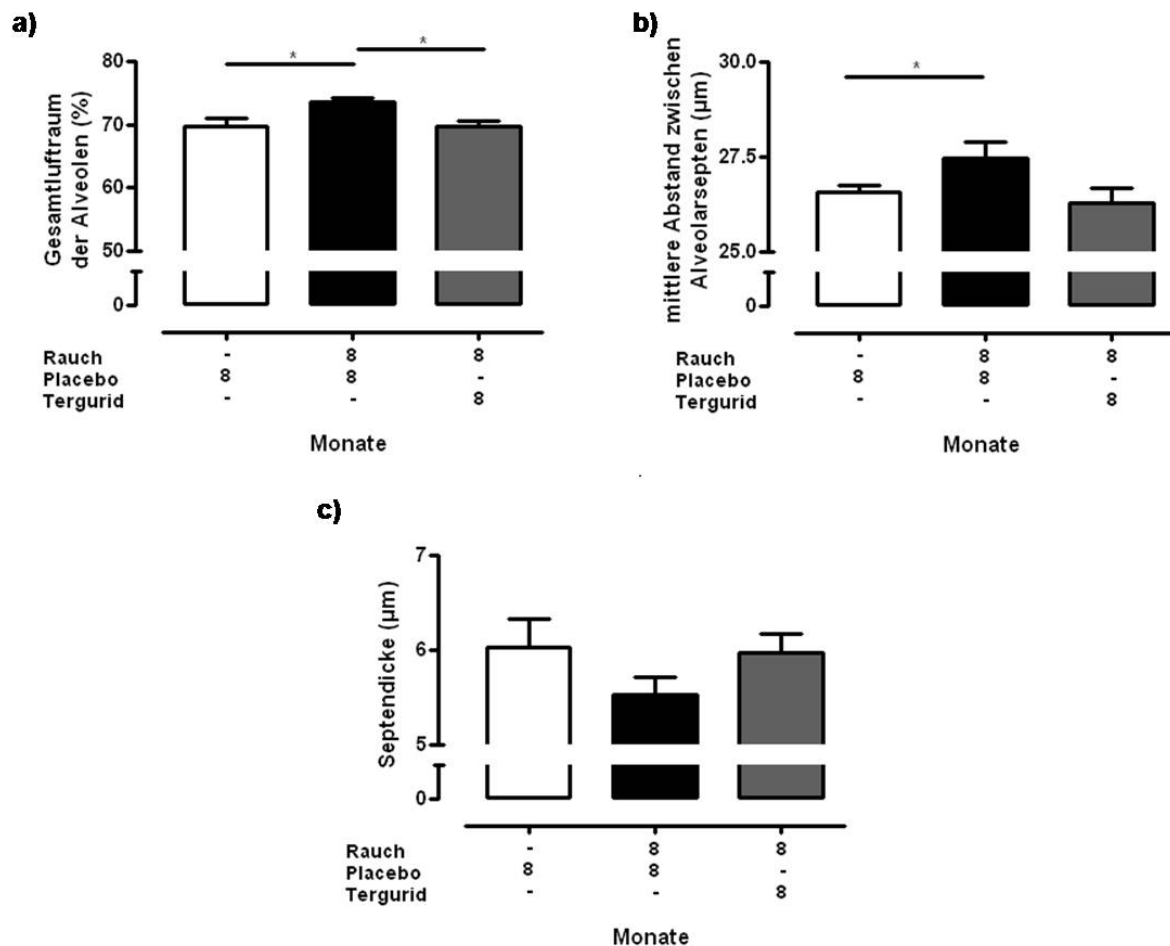


Abbildung 4.9: Darstellung der präventiven Tergurid-Behandlung auf die Emphysementwicklung nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Mittels alveolärer Morphometrie an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Lungenschnitten wurde der Effekt von Tergurid auf die Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems quantifiziert. Bestimmt wurden die Parameter (a) Gesamtluftraum auf alveolarer Ebene in (%), (b) mittlerer Abstand zwischen Alveolarsepten und (c) die Septendicke. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$), je $n = 8$.

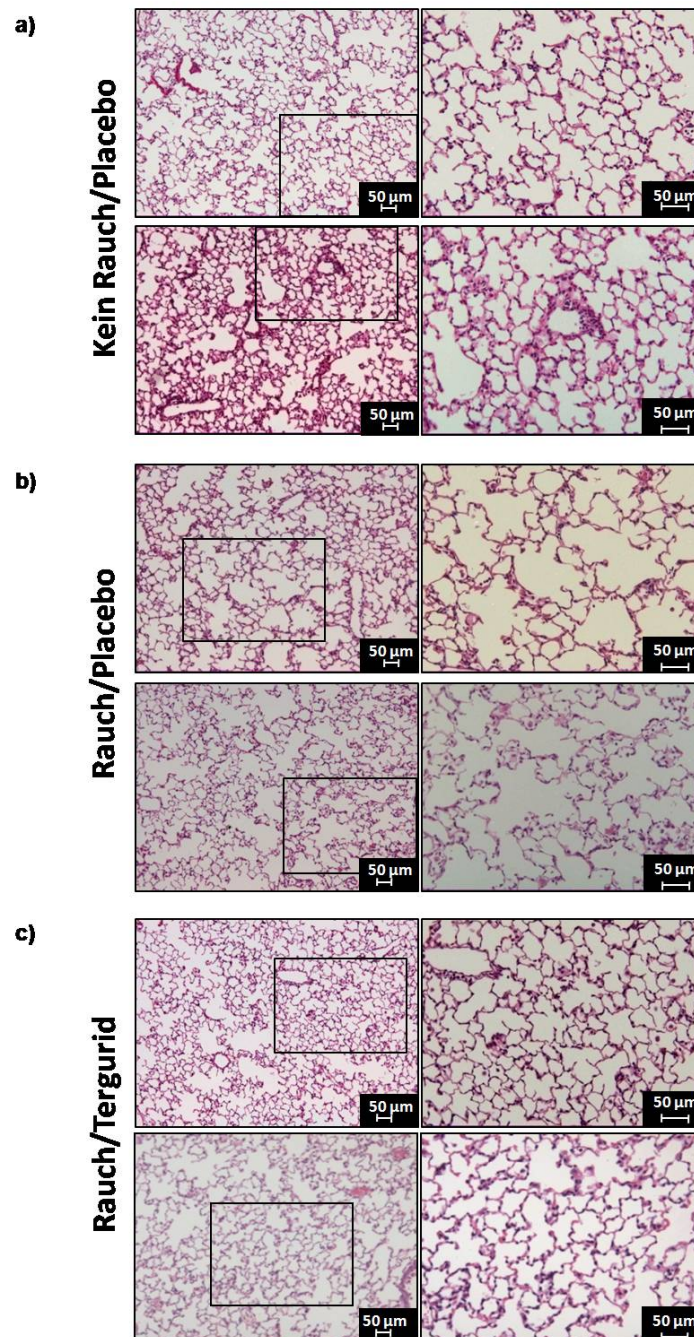


Abbildung 4.10: Repräsentative histologische Bilder zur Alveolarstruktur von Tergurid-behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition im Vergleich zu den Kontrollgruppen

Die Alveolen wurden mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung visualisiert. **(a)** Placebo-behandelte Kontrollgruppe (kein Rauch/Placebo), **(b)** Placebo-behandelte 8-monatige Rauch-exponierte Kontrollgruppe (Rauch/Placebo) und **(c)** Tergurid-behandelte 8-monatige Rauch-exponierte Therapiegruppe (Rauch/Tergurid). Dargestellt sind repräsentative Bilder von je 2 Mäusen pro Behandlungsgruppe. Das jeweils rechte Bild ist eine vergrößerte Darstellung des markierten Bereichs der linken Abbildung.

4.6 Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie und den pulmonal-vaskulären Umbau (*Remodeling*)

Um die Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie zu charakterisieren, wurden zunächst hämodynamische Untersuchungen zur Bestimmung des systemisch-arteriellen Druckes (SAP) und des systolischen rechtsventrikulären Druckes (RVSP) durchgeführt. Aus

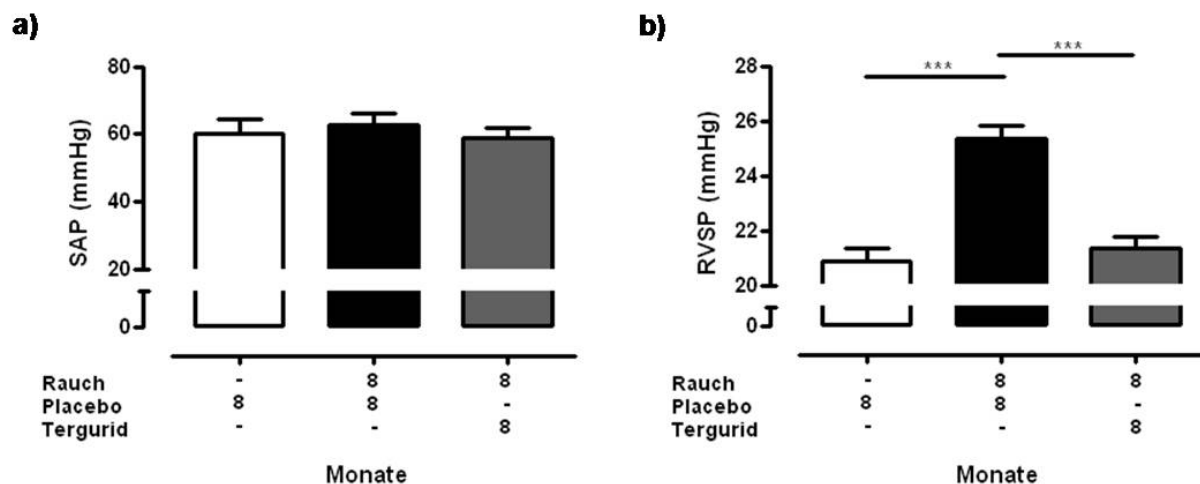


Abbildung 4.11a geht hervor, dass sich der mittlere SAP der einzelnen Versuchsgruppen nicht voneinander unterschied. Für die Placebo-behandelte nicht Rauch-exponierte Kontrollgruppe betrug der SAP 60,2 mmHg \pm 1,2 mmHg. In der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe lag er bei 62,8 mmHg \pm 3,4 mmHg und in der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Gruppe betrug der SAP 58,9 mmHg \pm 3,1 mmHg. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Tergurid keinen Einfluss auf den SAP und folglich keine systemische vasodilatative Wirkung zu haben scheint.

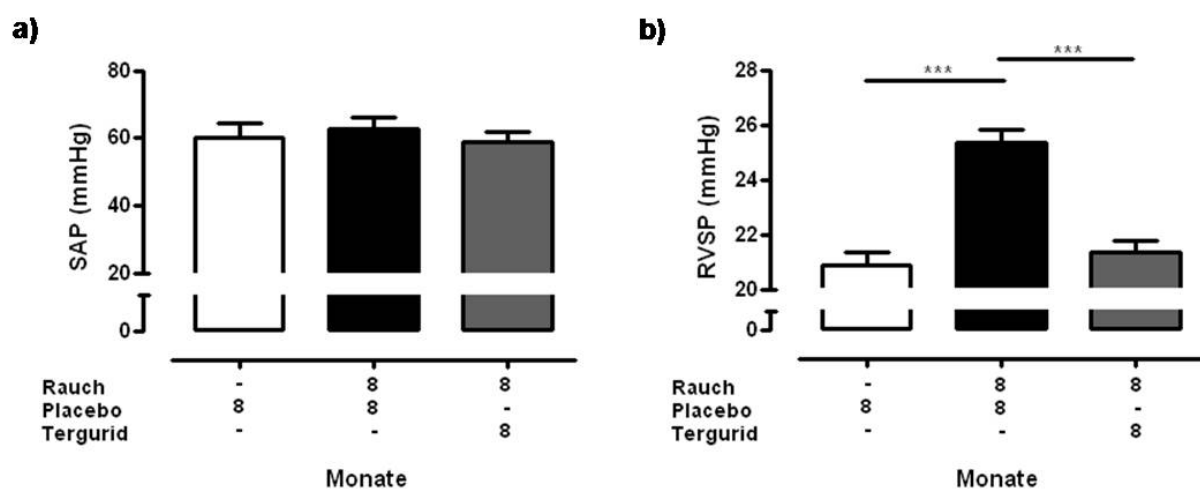


Abbildung 4.11b zeigt, dass der RVSP der Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten

Kontrollgruppe bei $20,9 \text{ mmHg} \pm 0,5 \text{ mmHg}$ lag. Der RVSP der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe betrug $25,3 \text{ mmHg} \pm 0,5 \text{ mmHg}$ und war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Der RVSP der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Gruppe war mit einem Wert von $21,4 \text{ mmHg} \pm 0,4 \text{ mmHg}$ signifikant niedriger als der Druck der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Tiere. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Tergurid-Gruppe.

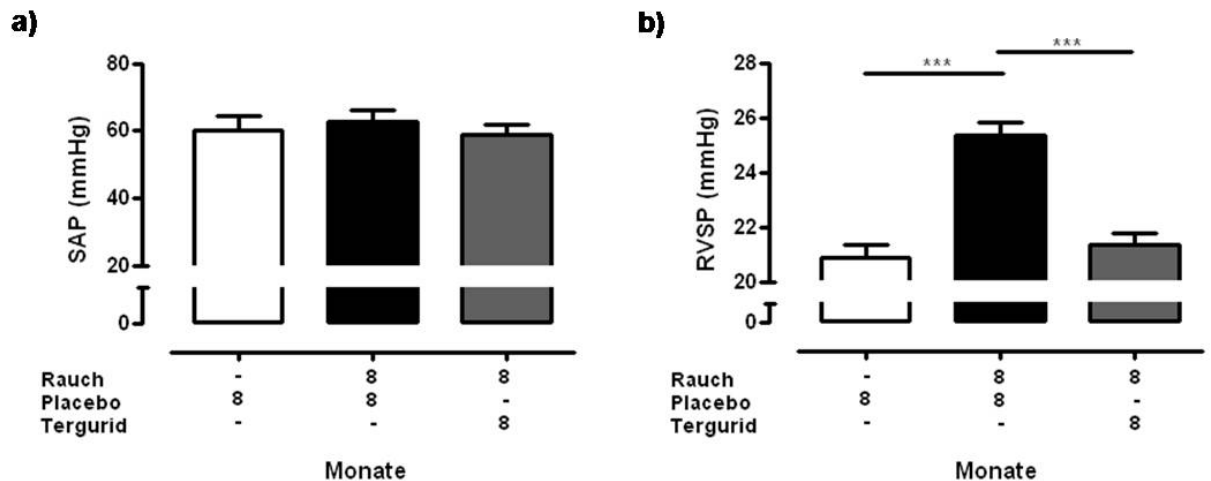


Abbildung 4.11: Darstellung des Effekts von Tergurid auf die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie der Mäuse nach 8-monatiger Rauchexposition.

Alle Mäuse wurden jeweils vor und nach der Rauch-Exposition entweder mit 1 mg/kg Körpergewicht Tergurid oder Placebo via Gavage behandelt. Nach 8-monatiger Rauch-Exposition wurden die Druckveränderungen durch Messung (a) des systolischen arteriellen Druckes (SAP) und (b) des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) via Hämodynamik bestimmt. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (***: $p < 0,001$), je $n = 16$.

Eine Erhöhung der rechtsventrikulären systolischen Drücke kann zu einer pathologischen Vergrößerung (Hypertrophie) des Muskelgewebes im rechten Ventrikel des Herzens (Rechtsherzhypertrophie) führen [230]. Um den Effekt von Tergurid auf eine mögliche Rechtsherzhypertrophie zu untersuchen, wurde zunächst der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel plus Septum getrennt und das Trockengewicht bestimmt. Zur Ermittlung des Ausmaßes der Rechtsherzhypertrophie wurde die Herzratio (RV / LV+S) kalkuliert. Die Masse des rechten Ventrikels der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse war im Vergleich zur Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Masse des rechten Ventrikels der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäuse gegenüber der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse war signifikant niedriger (Abbildung 4.12a). Im Gegensatz dazu konnten keine wesentlichen Unterschiede der Masse des linken Ventrikels plus Septum in den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Abbildung 4.12b), wodurch eine mögliche Linksherzhypertrophie ausgeschlossen werden konnte. Abbildung 4.12c zeigt, dass die Herzratio der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Tiere im Vergleich zu den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Tieren als auch zu den

Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Tieren signifikant höher war. Die Ratio der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Tiere unterschied sich nicht von der nicht-Rauch-exponierten Kontrollgruppe.

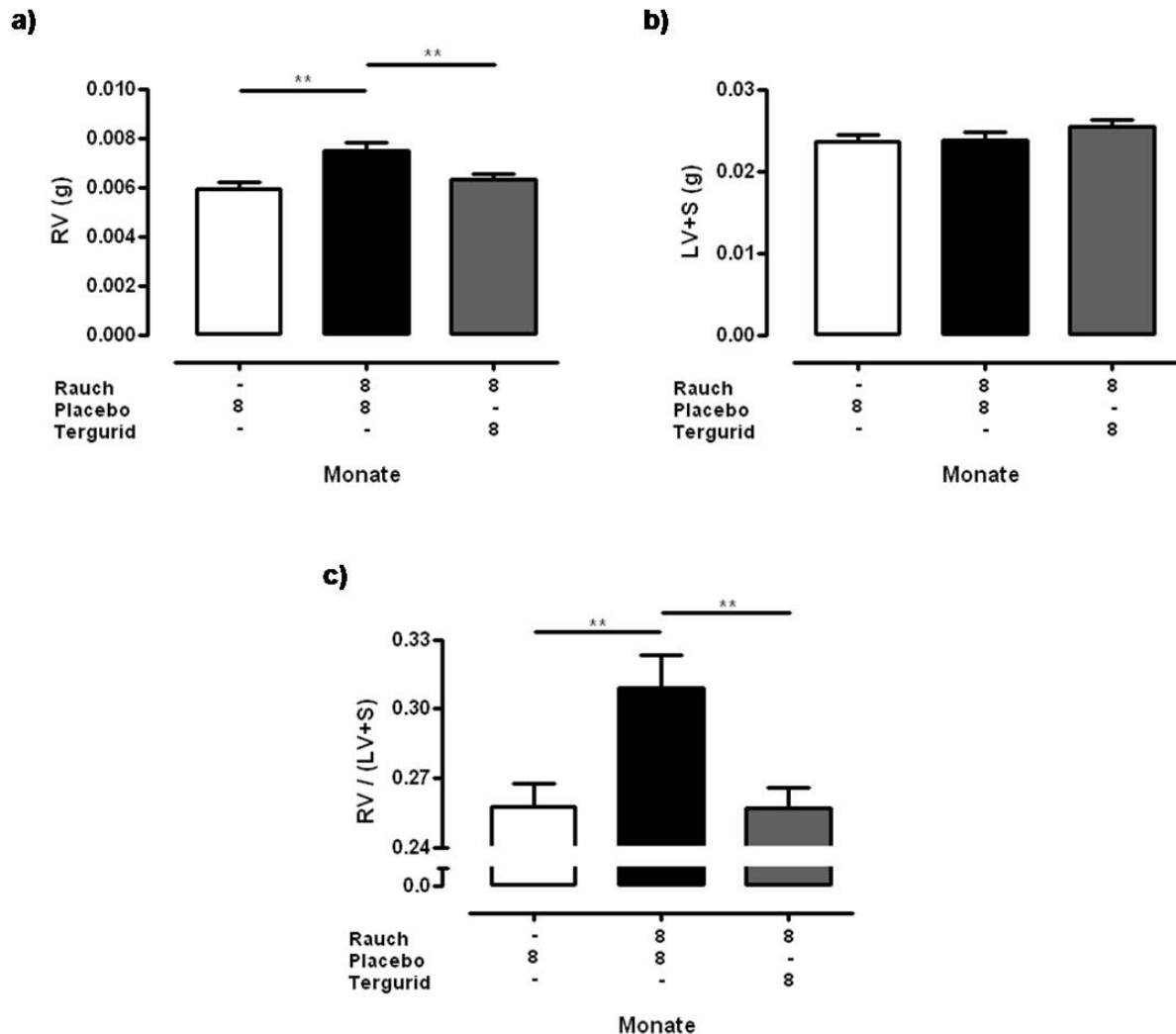


Abbildung 4.12: Veränderungen des Gewichts des rechten und linken Ventrikels plus Septum und deren Verhältnis unter präventiver Tergurid-Behandlung nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Alle Mäuse wurden jeweils vor und nach der Rauch-Exposition entweder mit 1 mg/kg Körpergewicht Tergurid oder Placebo via Gavage behandelt. Nach 8-monatiger Rauch-Exposition wurden die einzelnen Herzabschnitte separiert und gewogen. **(a)** Masse des rechten Ventrikels (RV), **(b)** Masse des linken Ventrikels plus Septum (LV+S) und **(c)** Gewichtsverhältnis vom rechten Ventrikel zum linken Ventrikel plus Septum (RV / LV+S). Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (**: $p < 0,01$), $n = 13-16$.

Um das Ausmaß des vaskulären *Remodelings* unter der präventiven Medikation von Tergurid genauer beurteilen zu können, wurde der Muskularisierungsgrad der Lungengefäße morphometrisch bestimmt. Hierfür wurden das Endothel mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors und die glatte Muskulatur mit *alpha smooth muscle actin* immunhistochemisch gefärbt. Zur Bestimmung der Muskularisierung wurden die Gefäße in drei Größenkategorien unterteilt, in denen jeweils 100 Gefäße ausgezählt wurden. Abbildung 4.13a stellt den Muskularisierungsgrad der kleinen Gefäße (20-70 μm) dar. In Anbetracht der voll-muskularisierten Gefäße wurden innerhalb der Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäuse nur $4,3 \% \pm 1,1 \%$ der Gefäße erfasst. Signifikant höher mit $11,2 \% \pm 0,8 \%$ war der Muskularisierungsgrad der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse. Bei den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen wurden nur $7,5 \% \pm 0,8 \%$ als voll-muskularisiert ermittelt und somit lag die Anzahl der voll-muskularisierten kleinen Gefäße signifikant niedriger als die der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse. Der Anteil der partiell-muskularisierten Gefäße der Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäuse lag bei $32,7 \% \pm 1,7 \%$. Im Vergleich dazu waren die partiell-muskularisierten Gefäße der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse mit $52,3 \% \pm 1,4 \%$ signifikant erhöht. In den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen konnte mit $43,5 \% \pm 3,1 \%$ keine signifikante Veränderung des Muskularisierungsgrades zur Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe festgestellt werden. Der Anteil an nicht-muskularisierten kleinen Gefäßen war in der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe mit $35,9 \% \pm 2,3 \%$ im Vergleich zu der Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Gruppe mit $62,9 \% \pm 1,6 \%$ signifikant reduziert. Gegenüber der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe zeigten die Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäuse mit $49,2 \% \pm 3,1 \%$ einen signifikant niedrigeren Muskularisierungsgrad. Aus Abbildung 4.13b geht hervor, dass es zu keiner deutlichen Veränderung des Muskularisierungsgrades zwischen den einzelnen Versuchsgruppen in den voll-, partiell- und nicht-muskularisierten mittleren Gefäßen (71 - 150 μm) kam. Das gleiche Ergebnis kann für den Muskularisierungsgrad der großen Gefäße ($> 150 \mu\text{m}$) festgehalten werden (Abbildung 4.13c).

Repräsentative histologische Bilder zur vaskulären Morphometrie sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

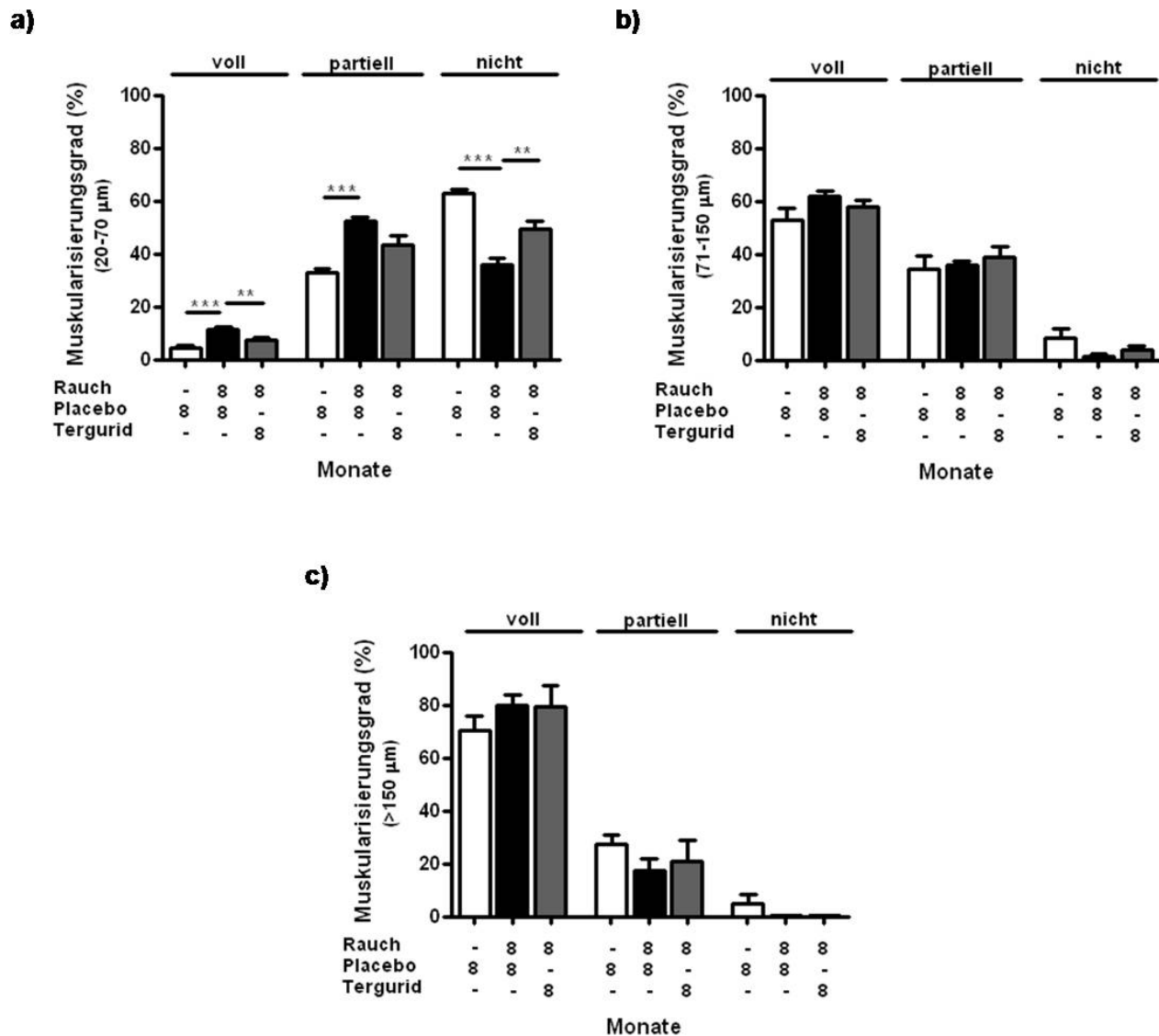


Abbildung 4.13: Darstellung des präventiven Effektes von Tergurid auf den prozentualen Anteil nicht-, partiell- und voll-muskularisierter Lungengefäße nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Mittels vaskularer Morphometrie an *alpha smooth muscle actin*- und von Willebrand-Faktor-doppelgefärbten Lungenschnitten wurde der Effekt von Tergurid auf die Entwicklung des Muskularisierungsgrades in Prozent (%) in den Gefäßen unterschiedlicher Größe quantifiziert. **(a)** Gefäße mit einem Durchmesser von 20 – 70 µm, **(b)** Gefäße mit einem Durchmesser von 71 - 150 µm und **(c)** Gefäße mit einem Durchmesser größer als 150 µm; voll = voll muskularisiert, partiell = teilweise muskularisiert, nicht = keine Muskularisierung. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$), je $n = 8$.

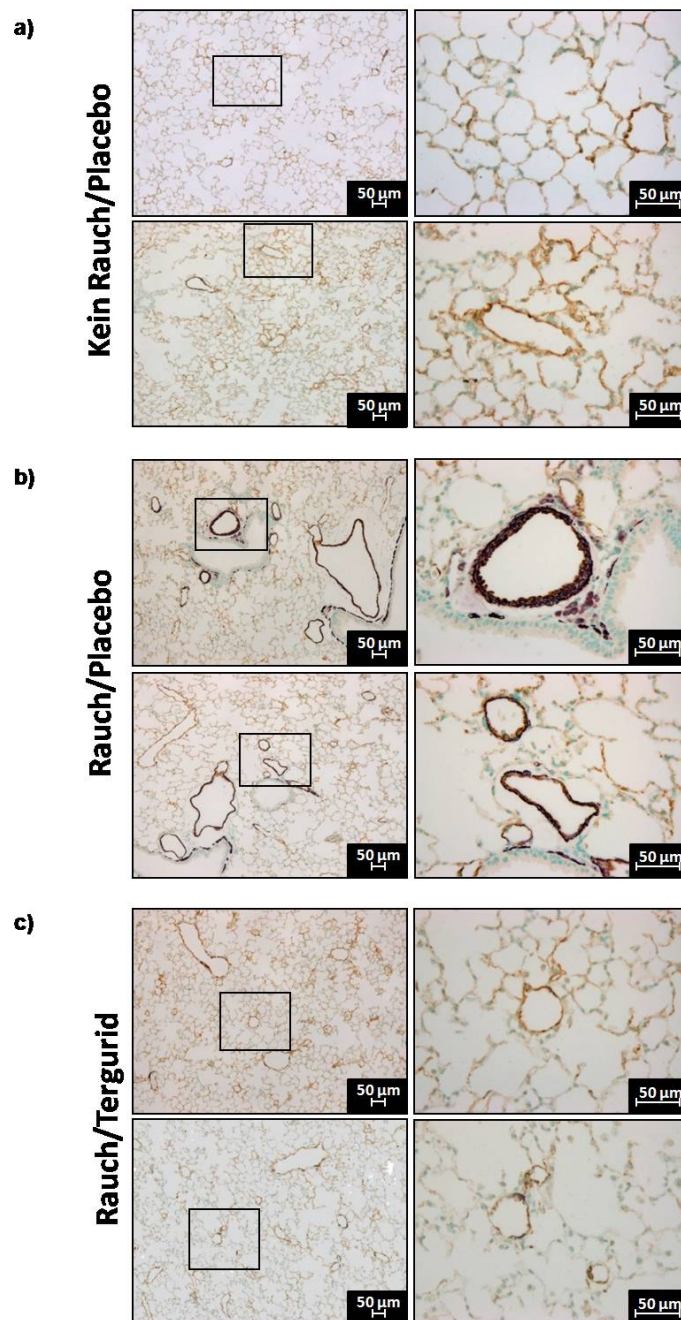


Abbildung 4.14: Repräsentative histologische Bilder zur Visualisierung der Muskularisierung pulmonaler Arterien in Tergurid-behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition

Die Muskularisierung wurde durch eine Doppel-Färbung mit Antikörpern gegen α -smooth muscle actin und von-Willebrand-Faktor visualisiert. (a) Placebo-behandelte Kontrollgruppe (kein Rauch/Placebo), (b) Placebo-behandelte 8-monatige Rauch-exponierte Kontrollgruppe (Rauch/Placebo) und (c) Tergurid-behandelte 8-monatige Rauch-exponierte Therapiegruppe (Rauch/Tergurid). Dargestellt sind repräsentative Bilder von je 2 Mäusen pro Behandlungsgruppe. Das jeweils rechte Bild ist eine vergrößerte Darstellung des markierten Bereichs der linken Abbildung.

4.7 Einfluss der präventiven Behandlung mit Tergurid auf das Verhältnis der Alveolen zu Gefäßen nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Ein weiteres Merkmal für eine vaskuläre Veränderung in Patienten mit COPD und in dem Rauch-induzierten Emphysemmodell an Mäusen ist der Verlust von kleinen Gefäßen [221]. Um den Einfluss der präventiven Applikation von Tergurid auf den Gefäßverlust unter Rauch-Exposition genauer zu untersuchen, wurde die Anzahl der Alveolen und der Gefäße an doppelgefärbten Lungenschnitten ausgezählt. Eine Verschiebung des Verhältnisses von Alveolen zu Gefäßen gibt Auskunft über einen relativen Verlust an Alveolen oder Gefäßen, wobei eine höhere Ratio ein Indiz für einen Gefäßverlust ist. Aus Abbildung 4.15 geht hervor, dass das Verhältnis an Alveolen zu Gefäßen in den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Mäusen signifikant erhöht war. Die Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäuse zeigten ein signifikant niedrigeres Verhältnis der Alveolen zu Gefäßen als die Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse.

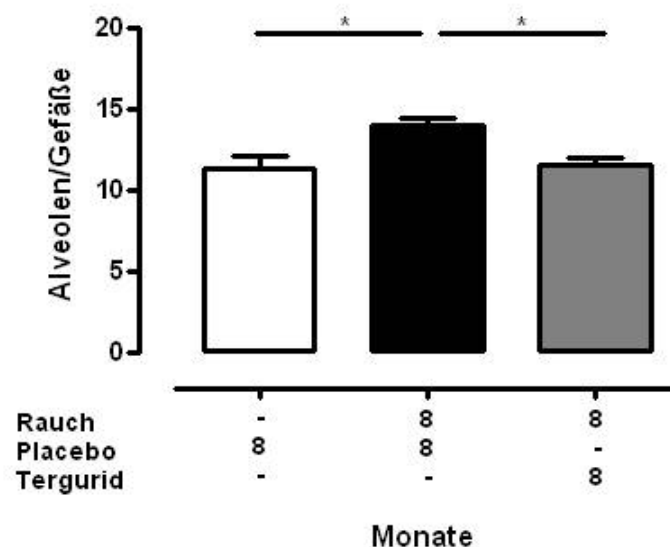


Abbildung 4.15: Darstellung des Verhältnisses der Alveolen zu Gefäßen unter Tergurid nach 8-monatiger Rauchexposition

In doppelgefärbten Lungenschnitten mit Antikörpern gegen α -smooth muscle actin und von Willebrand-Faktor wurden die Anzahl an Alveolen und Gefäßen ausgezählt und danach das Verhältnis von Alveolen zu Gefäßen (Alveolen/Gefäße) ermittelt. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$), $n = 3-4$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine präventive Behandlung der Rauch-exponierten Mäuse mit 1 mg/kg Tergurid keine ersichtlichen Nebenwirkungen in den Mäusen verursachte und im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen zu einer Gewichtszunahme führte. Des Weiteren zeigten Tergurid-behandelte Rauch-exponierte Mäuse eine Verbesserung der pathogenetisch veränderten Compliance und des pulmonalen Atemwegswiderstandes, sowie einen niedrigeren Gesamtluftraum der Alveolen im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen. Zudem führte eine präventive Medikation von Tergurid zu einem reduzierten rechtsventrikulären systolischen Druck, einer herabgesetzten Rechtsherzhypertrophie, einem reduzierten Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonalen Gefäße und zu einem geringeren Gefäßverlust im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen.

Um einen Eindruck über den molekularen Mechanismus des präventiven Effektes des Inhibitors Tergurid auf die Mäuse zu erhalten, erfolgte im nächsten Teil der Arbeit die Untersuchung potentiell involvierter Signalwege.

4.8 Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Serotonin-Konzentration im Plasma von 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen

Es ist bekannt, dass Rauchen bei Menschen zu einer erhöhten Ausschüttung von Serotonin führt, sobald Nikotin in den Blutkreislauf eintritt [231]. In Patienten mit COPD konnte ein erhöhter Spiegel an Serotonin im Plasma nachgewiesen werden [186]. Um nun die Konzentration an Serotonin im Plasma der Rauch-exponierten Mäuse und den Effekt des Serotonin-Inhibitors Tergurid auf die Serotonin-Konzentration zu ermitteln, wurde ein Serotonin-ELISA durchgeführt. Aus Abbildung 4.16 wird ersichtlich, dass die Serotonin-Konzentration im Plasma von Placebo-behandelten Rauch-exponierten Tieren signifikant niedriger war als im Plasma der Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrolltiere. Eine präventive Behandlung der Rauch-exponierten Mäuse mit Tergurid führte im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung des Serotonin-Spiegels im Plasma.

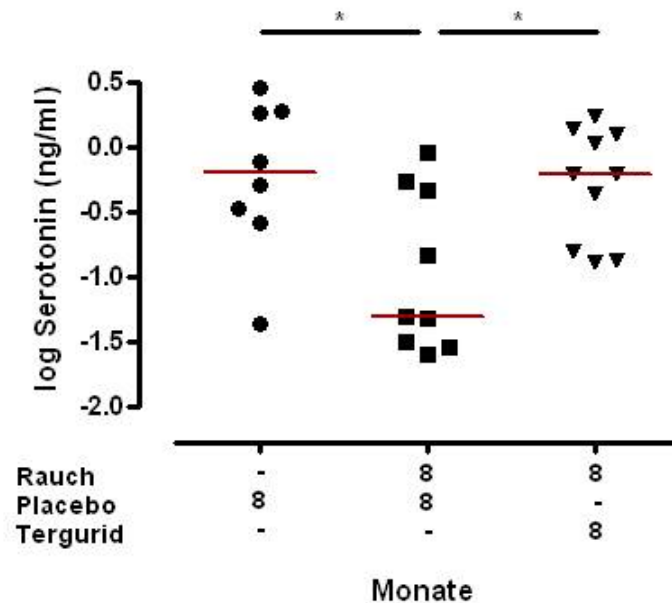


Abbildung 4.16: Serotonin-Konzentration im Plasma der Tergurid-behandelten Mäuse nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Mittels eines Serotonin-ELISA wurde der Serotoningehalt im Plasma von der Placebo-behandelten Kontrollgruppe, der Placebo-behandelten und 8 Monate Rauch-exponierten Kontrollgruppe und der Tergurid-behandelten, 8 Monate Rauch-exponierten Therapiegruppe bestimmt. Dargestellt ist der Serotoningehalt (ng/ml) in logarithmischer Auftragung. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$), $n = 8-10$.

4.9 Kompartiment-spezifische Expression der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) nach präventiver Behandlung mit Tergurid und 8-monatiger Rauch-Exposition

Um den Wirkmechanismus der präventiven Medikation von Tergurid auf die Rauch-induzierte Entwicklung des Emphysems und der pulmonalen Hypertonie detaillierter betrachten zu können, wurde zunächst die Expression der Serotoninrezeptoren (5-HT_{2A/2B}) und des Serotonintransporters (5-HTT) Kompartiment-spezifisch geklärt. Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion wurden aus Lungenquerschnitten der einzelnen Versuchsgruppen Gefäße und Alveolar-Septen getrennt voneinander isoliert, gefolgt von Genexpressionsanalysen mittels Real-Time PCR. Abbildung 4.17a zeigt, dass der 5-HT_{2A}-Rezeptor in den pulmonalen Gefäßen der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäuse im Vergleich zu den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten und Rauch-exponierten Mäusen signifikant niedriger

exprimiert war. Im Expressionsprofil von 5-HT_{2B}-Rezeptor in pulmonalen Gefäßen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ersichtlich. In den pulmonalen Gefäßen der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen konnte eine signifikante Hochregulation der mRNA des Serotonintransporters (5-HTT) festgestellt werden. Die pulmonalen Gefäße der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Gruppe zeigten eine signifikant niedrigere Expression der 5-HTT mRNA im Vergleich zur Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe. Abbildung 4.17b stellt das mRNA-Expressionsprofil von 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} und 5-HTT in den Alveolar-Septen der einzelnen Versuchsgruppen dar. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von 5-HTR_{2A} in den Versuchsgruppen. In Bezug auf den 5-HT_{2B}-Rezeptor und den 5-HT-Transporter wird ersichtlich, dass beide in den Alveolar-Septen der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse verglichen mit den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Mäusen signifikant hochreguliert waren. Im Vergleich zu den Alveolar-Septen der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Tiere kam es in den Alveolar-Septen der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Tieren zu einer signifikanten Runterregulation der mRNA von 5-HTR_{2B} und 5-HTT.

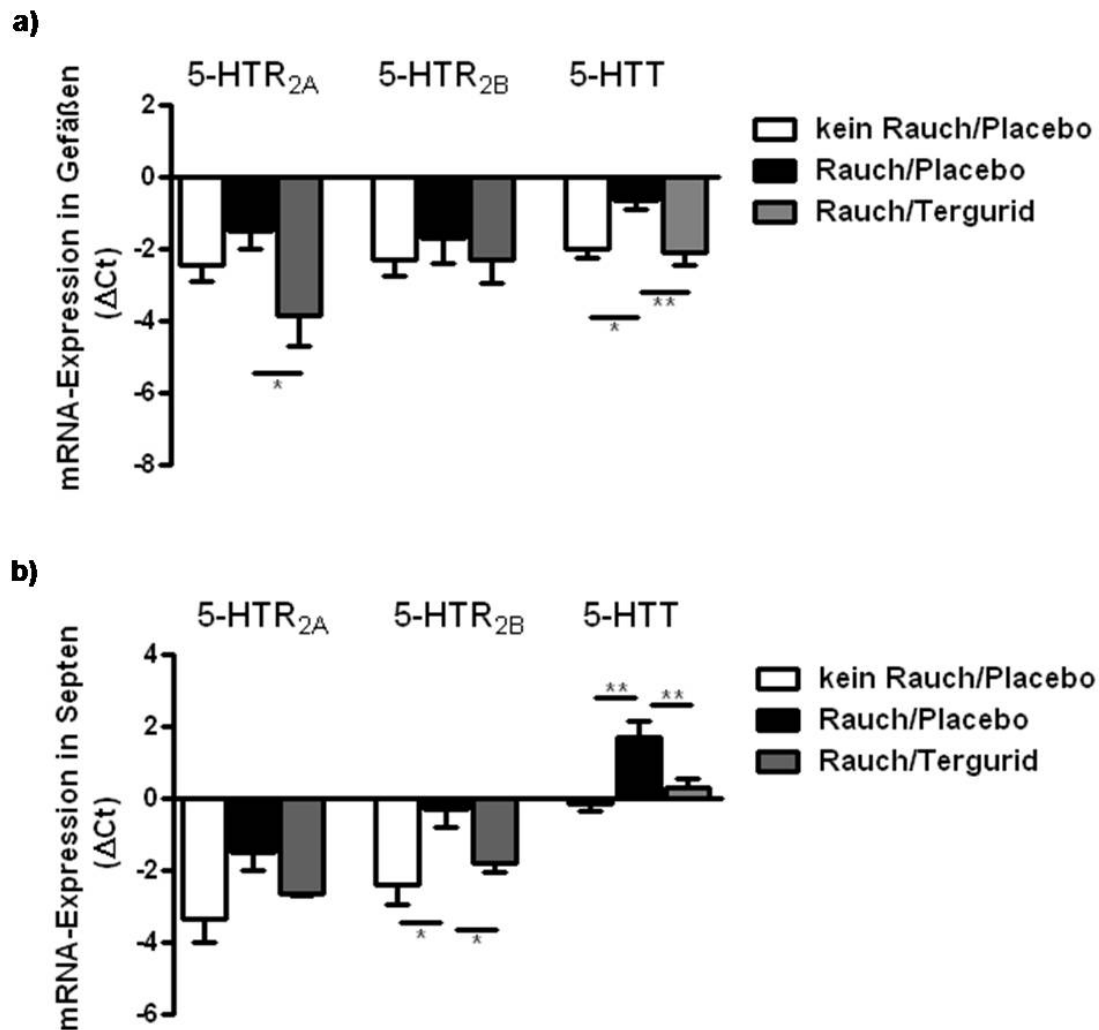


Abbildung 4.17: mRNA-Expression von 5-HTR_{2A}, 5-HTR_{2B} und 5-HTT in mikrodisssektierten Gefäßen und Alveolar-Septen nach präventiver Tergurid-Behandlung und 8-monatiger Rauch-Exposition

Quantitative Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpressionen der Serotoninrezeptoren (5-HTR_{2A/2B}) und des Serotonintransporters (5-HTT) in **(a)** mikrodisssezierten pulmonal-arteriellen Gefäßen und **(b)** alveolären Septen. Die mRNA wurde aus der Placebo-behandelte Kontrollgruppe (kein Rauch/Placebo), der Placebo-behandelten, 8 Monate Rauch-exponierter Kontrollgruppe (Rauch/Placebo) und der Tergurid-behandelten, 8 Monate Rauch-exponierten Therapiegruppe (Rauch/Tergurid) isoliert. Die jeweiligen Ct-Werte wurden auf das Referenzgen PBGD normalisiert ($\rightarrow \Delta Ct$). Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

4.10 Expression von 3-Nitrotyrosin im Lungenhomogenat von präventiv behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Auf der Suche nach einem möglichen *downstream*-Wirkmechanismus des Serotonin-Inhibitors Tergurid wurde im folgenden Abschnitt eine potentielle 3-Nitrotyrosin-Bildung fokussiert. 3-Nitrotyrosin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die in Organismen durch Einwirkung der reaktiven Stickstoffspezies Peroxinitrit auf die proteinogene Aminosäure Tyrosin gebildet wird [232]. In der Labordiagnostik wird 3-Nitrotyrosin z.B. als Biomarker für Lungenerkrankungen [233] und Zellapoptose [234] eingesetzt. Aus der Literatur ist bekannt, dass es in COPD-Patienten zu einer Fehlregulation der Nitrotyrosin-Bildung kommen kann [235, 236]. Zusätzlich ist publiziert, dass es zu einer erhöhten Nitrotyrosin-Bildung in Rauch-exponierten Mäusen kommt [221]. Um eine mögliche Reduktion der Nitrotyrosin-Generierung in berauchten Mäusen durch die Behandlung von Tergurid zu untersuchen, wurde zunächst eine immunhistochemische Färbung an Lungenschnitten der verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt (Abbildung 4.18a). Anhand der Intensität der violetten Färbung kann vermutet werden, dass es zu einer vermehrten Nitrotyrosin-Bildung in den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu den Placebo behandelten nicht-Rauch-exponierten Mäusen gekommen ist. In den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen konnte keine deutliche Reduktion der violetten Färbung zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen erkannt werden. Um die Nitrotyrosin-Formation quantitativ zu bestimmen, wurde die Protein-Expression in den einzelnen Versuchsgruppen analysiert und verglichen. Abbildung 4.18b bestätigte die Nitrotyrosin-Färbung. Die Nitrotyrosin-Expression war in den Placebo und in den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Tieren verglichen mit der Expression in den Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Kontrolltieren signifikant erhöht.

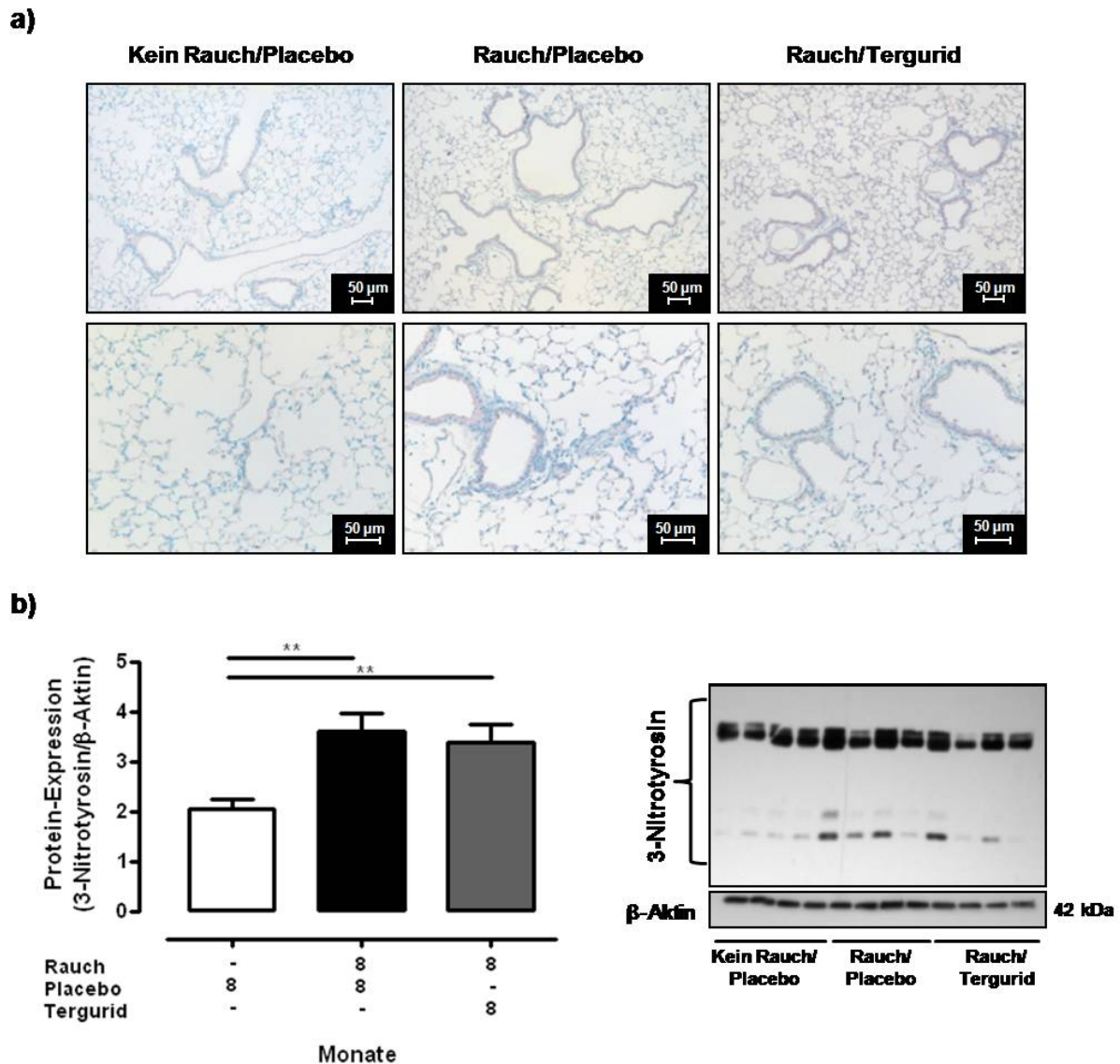


Abbildung 4.18: Darstellung der 3-Nitrotyrosin-Bildung in Tergurid-behandelten und 8-monatigen Rauch-exponierten Mäusen

(a) Repräsentative Bilder immunhistologischer Färbungen spezifisch gegen 3-Nitrotyrosin an Mäusen von präventiv mit Tergurid oder Placebo-behandelten Versuchstieren nach 8-monatiger Rauch-Exposition. Nitrotyrosin erscheint aufgrund des verwendeten Substrats violett. (b) Western Blot-Analysen zur Bestimmung der Protein-Expression von 3-Nitrotyrosin aus Lungenhomogenat von nicht-Rauch-exponierten Placebo-behandelten Mäusen (kein Rauch/Placebo), Rauch-exponierten Placebo-behandelten Mäusen (Rauch/Placebo) und Rauch-exponierten Tergurid-behandelten Mäusen (Rauch/Tergurid). Normalisiert wurde zum Referenz-Protein β-Aktin. Die densitometrische Auswertung ist im linken und ein repräsentativer Western Blot im rechten Teil der Abbildung dargestellt, $n = 7$. Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstieren (**: $p < 0,01$).

4.11 Wirkung von Serotonin und Tergurid auf Zelltyp-spezifische Apoptose und Proliferation

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Serotonin und/oder Tergurid auch Einfluss auf zelluläre Prozesse, wie das Proliferations- und Apoptose-Verhalten haben. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl eine erhöhte Apoptose-Rate als auch eine reduzierte Proliferation der alveolären Zellen maßgeblich bei der Entwicklung einer COPD/Emphysem involviert sind [20, 237-239].

Aus Abbildung 4.19a geht hervor, dass weder Tergurid noch Serotonin einen Effekt auf die Apoptose-Rate muriner Endothelzellen hatten. Abbildung 4.19b zeigt, dass Tergurid in einer Konzentration von 1 nM, 1 μ M und 10 μ M die Apoptose-Rate der murinen alveolären Epithelzellen (AECII) im Vergleich zu den nicht-behandelten Zellen (Negativkontrolle) nicht veränderte. Eine Applikation von 1 nM und 1 μ M Tergurid in Kombination mit 1 μ M Serotonin verglichen mit den Serotonin-behandelten AECII-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose-Rate.

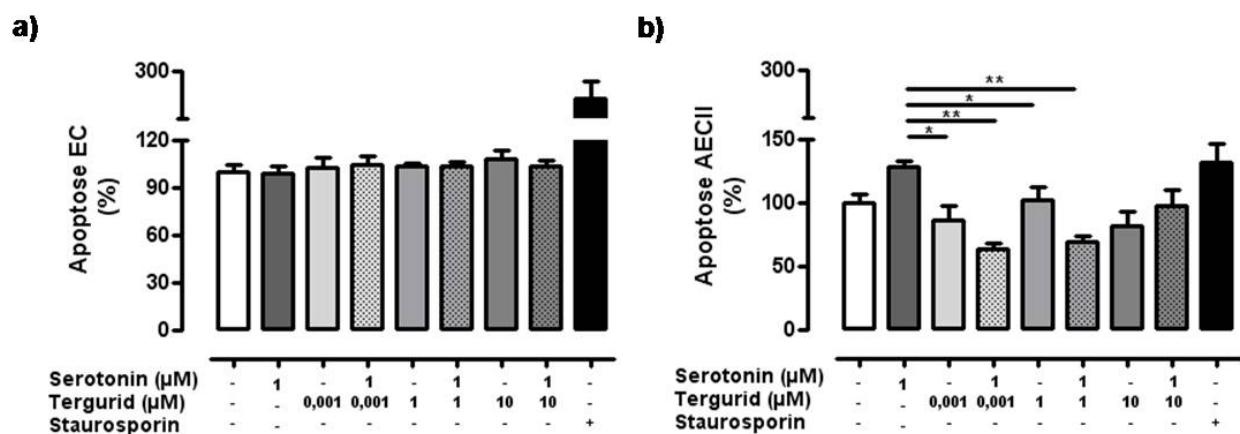


Abbildung 4.19: Effekt von Serotonin und/oder Tergurid auf die Apoptose-Rate muriner Endothel- und Epithelzellen

Mittels Caspase-Aktivität wurde die Apoptose in Abhängigkeit einer Applikation von Serotonin und/oder Tergurid in **(a)** murinen Endothelzellen (EC) und **(b)** murinen alveolären Epithelzellen Typ II untersucht. Alle Proben wurden als Duplikate gemessen (biologisches n = 3, technisches n = 4-6). Staurosporin (Positivkontrolle); nur Zellen (Negativkontrolle). Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Abbildung 4.20a zeigt, dass weder Tergurid noch Serotonin einen Effekt auf die Proliferation muriner Epithelzellen (AECII) hatten. Aus Abbildung 4.20b geht hervor, dass Tergurid in einer Konzentration von 1 nM, 1 μ M und 10 μ M die Proliferation der murinen Endothelzellen im Vergleich zu den nicht-behandelten Zellen (Negativkontrolle) nicht veränderte. Hingegen erhöhte Serotonin in einer Konzentration von 1 μ M die Proliferation der ECs signifikant. Eine Applikation von 10 μ M Tergurid in Kombination mit 1 μ M Serotonin verglichen mit den Serotonin-behandelten AECII-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation.

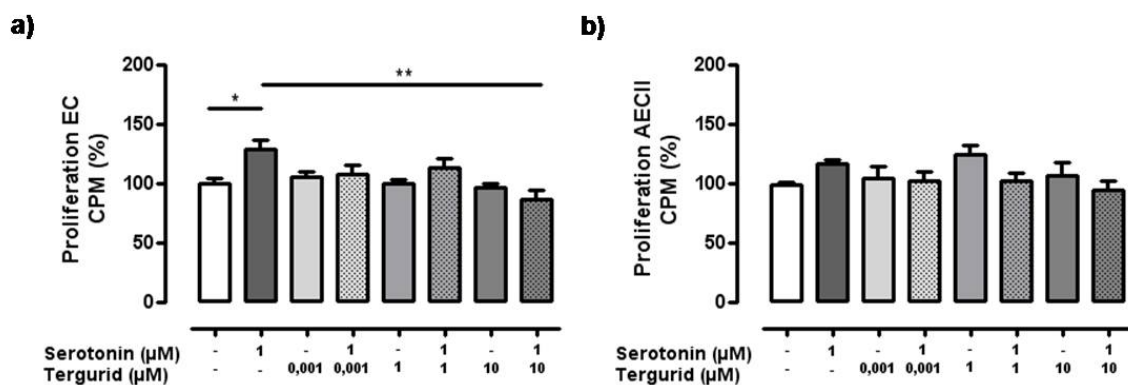


Abbildung 4.20 Effekt von Serotonin und/oder Tergurid auf die Proliferation muriner Endothel- und Epithelzellen

Mittels ^3H -Thymidin-Proliferationsassay wurde die Proliferation in Abhängigkeit einer Applikation von Serotonin und/oder Tergurid in **(a)** murinen Endothelzellen (EC) (biologisches $n = 7$, technisches $n = 4-8$) und **(b)** murinen alveolären Epithelzellen Typ II (biologisches $n = 11$, technisches $n = 9-18$), untersucht. Nur Zellen (Negativkontrolle). Die schwarzen Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). CPM = *Counts per minute*.

5 Diskussion

Weltweit gehört die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zu den häufigsten Todesursachen und ist eine der wenigen Erkrankungen mit steigender Inzidenz, was, neben dem enormen Leiden für die Patienten, in einer zunehmenden hohen wirtschaftlichen als auch sozialen Belastung resultiert [1-3]. Leider gibt es bis heute noch keinen Therapieansatz, der die individuelle Progression der COPD-Erkrankung verhindert oder gar reversieren kann. Derzeit können lediglich die Symptome gelindert und die Lebensqualität der COPD-Patienten etwas verbessert werden [19, 97]. Die genauen molekularen Mechanismen, die zur Pathogenese der COPD führen, sind größtenteils unbekannt. Weltweit scheint jedoch die Hauptursache für eine COPD-Erkrankungen die Inhalation von Zigarettenrauch zu sein [30]. Viele Studien deuten darauf hin, dass Zigarettenrauch zu einer Dysregulation des serotonergen Systems führt und somit eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COPD übernehmen kann [182, 186, 187, 192, 196, 240]. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Rolle der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B}, sowie des Serotonintransporters in Lungen von COPD-Patienten und in Rauch-exponierten Mäusen detaillierter zu untersuchen und herauszufinden, ob eine präventive Inhibition der beiden Serotonin-Rezeptoren in Rauch-exponierten Mäusen eine neue Option zur Behandlung von COPD sein könnte.

5.1 Die Wahl des Tiermodells

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell zum Rauch-induzierten Lungenemphysem an Mäusen gewählt. In diesem Modell werden C57BL6/J-Mäuse in einer Rauchkammer 6 Stunden pro Tag und 5 Tage pro Woche einer Partikelkonzentration von 140 mg/m³ ausgesetzt. Nach 3 Monaten Rauch-Exposition sind vaskuläre Veränderungen in Form von Gefäßumbauprozessen (*Remodeling*) und einer Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Druckes (RVSP) ersichtlich. Nach 8 Monaten Rauchexposition können emphysematöse Veränderungen, resultierend in einer erhöhten Lungen-Compliance und einem verringerten Atemwegwiderstand beobachtet werden. Neben den funktionellen Veränderungen stellen eine Vergrößerung des Luftraums in den Alveolen, eine Erhöhung des mittleren Abstandes zwischen den Alveolarsepten und eine Verringerung der Septendicke ein ausschlaggebendes Kriterium für die Entwicklung eines Emphysems dar. Des Weiteren zeigen die Mäuse nach 8 Monaten Rauch-Exposition eine Rechtsherzhypertrophie. Das Rauchmodell zeigt somit vaskuläre und alveoläre Veränderungen, die auch bei COPD-Patienten zu finden sind [221].

Das Rauch-induzierte Maus-Modell schafft folglich eine gute Forschungsgrundlage, um Untersuchungen zum Lungenemphysem in Verbindung mit einer pulmonalen Hypertonie durchführen zu können. Durch den Einsatz dieses Modells können sowohl der Zeitverlauf des sich entwickelnden Emphysems assoziiert mit einer PH als auch die etablierte Erkrankung untersucht werden, um neue Erkenntnisse über die Pathogenese des Emphysems zu erlangen. Darüber hinaus bietet das Modell die Möglichkeit präventive als auch kurative Interventionen zu analysieren und könnte somit von großem Nutzen für die Entwicklung neuer Therapieansätze für COPD-Patienten sein [221]. In vorangegangenen Studien wurden vergleichbare Modelle für die Untersuchungen einer Zigarettenrauch-induzierten Emphysems genutzt, bei denen neben Mäusen, Meerschweinchen, Hasen, Ratten und auch Hunde beraucht wurden [59, 73, 241-243]. In dieser Arbeit wurde sich bewusst für die Verwendung von Mäusen entschieden, da das Maus-Genom vollständig sequenziert ist [218], was molekulare Aussagen erleichtert. Die Mäuse an sich sind leicht zu halten und haben sich für eine Langzeit-Rauch-Expositionen als gut geeignet erwiesen. Darüber hinaus entspricht die zeitliche Entstehung des Lungenemphysems, bezogen auf die Lebensspanne, bei Mäusen in etwa der des Menschen. Dennoch gibt es einige Aspekte, die bei der Anwendung von Rauch-exponierten Mäusen beachtet und im Vergleich zur humanen COPD kritisch beobachtet werden müssen:

- Die Diagnose von COPD in Menschen basiert größten Teils auf einer Evaluierung spezifischer Symptome (z.B. chronischer Husten, chronischer Auswurf, fortschreitenden und anhaltende Atemnot), die bei Mäusen nicht imitiert werden können [244];
- Viele Faktoren (siehe Abbildung 2.6) können zu der Pathogenese von COPD beitragen. Im verwendeten Maus-Modell wird nur der Faktor Zigarettenrauch induziert. Jedoch kann festgehalten werden, dass egal durch welchen Faktor und den damit verbundenen Signalweg ein Lungenemphysem ausgelöst wird, es immer in einem gleichartigen histologischen Endstadium endet, sich jedoch der Schweregrad unterscheiden kann [244];
- Bei Langzeit-Rauch-Expositionen sollten Jungtiere verwendet werden, die die postnatale Alveolarisierung abgeschlossen haben (bei der Maus mit ca. 3 Wochen) [245]. Um dennoch eine Entwicklungsverzögerung des Lungenwachstums durch die Inhalation von Rauch ausschließen zu können, müssen gleichaltrige nicht-Rauch-exponierte Kontrollen mitgeführt werden [244];

- Eine Inhalation von Rauch kann in einer Reduktion des Gewichts resultieren, welches selbst zu einer Ausbildung eines Emphysems führen kann. Um diesen Aspekt ausschließen zu können, müssen die Mäuse in ihrem Gewicht regelmäßig kontrolliert werden [244];
- Im Mausmodell wurde eine Abnahme des Atemwegwiderstands festgestellt, wohingegen COPD-Patienten einen erhöhten Atemwegwiderstand aufweisen [242]. Diese Divergenz kann jedoch durch die Unterschiede der Luftwegsanatomie bei Mäusen in Kombination mit deutlich geringerer end- und expiratorischer Schließung der terminalen Atemwege erklärt werden [228, 229]. Zudem untersucht diese Arbeit eine Fragestellung bezüglich eines Lungenemphysems assoziiert mit einer PH und befasst sich nicht mit der Obstruktion der Atemwege in COPD [221]. Das Mausmodell ist somit ein gutes Emphysem- aber kein Atemwegsobstruktionsmodell.
- Mäuse des Rauch-induzierten Modells entwickeln nur milde strukturelle und mechanische Veränderungen in der Lunge, welche mit dem GOLD-II-Stadium von COPD-Patienten vergleichbar sind. Dennoch ist das Modell von großem Nutzen, da man davon ausgehen kann, dass Behandlungen, die in den frühen Stadien der COPD eine positive Wirkung zeigen auch Effekte auf die späteren Stadien haben werden [224, 225].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass trotz der kritisch zu beachteten Aspekte das Modell zur Rauch-induzierten Entwicklung von Emphysem und PH in Mäusen bisher wichtige Erkenntnisse über die Pathogenese des Lungenemphysems assoziiert mit einer PH geliefert hat und auch zukünftig wichtige Erkenntnisse liefern wird, was zu neuen möglichen Therapiekonzepten führen kann [221, 246].

5.2 Expressions-Analysen der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) bei COPD-Patienten (GOLD-IV) und in Rauch-exponierten Mäusen

Es ist bekannt, dass Serotonin wichtige Aufgaben bei der Regulation der Lungenfunktion durch eine Interaktion mit den Rezeptoren 5-HTR_{2A/2B} übernimmt [119]. Viele Studien geben Hinweise darauf, dass ein gestörtes serotonerges System eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COPD haben kann [186]. Jedoch fehlen bisher detaillierte Untersuchungen zu den genauen Mechanismen. Es existieren jedoch Beweise, dass 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} in humanem Lungengewebe [247], als auch in Lungen-Epithelzellen und Fibroblasten lokalisiert

sind und dort auch exprimiert werden [221, 248, 249]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} als auch der Serotonintransporter (5-HTT) an der Entwicklung einer PH und einer pulmonalen Fibrose beteiligt sind und somit auch in die Pathogenese der COPD mit assoziierter PH verwickelt sein könnten [119, 170, 191, 197, 205]. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst das Expressionsmuster der beiden Rezeptoren und des Transporters im Lungenhomogenat von COPD-Patienten analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene im Lungenhomogenat von COPD-Patienten (GOLD-IV) signifikant höher exprimiert waren als in Donoren (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2a, b). Hingegen konnte kein verändertes Expressionsmuster des 5-HTTs im Lungenhomogenat von COPD-Patienten festgestellt werden (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2c). Bisher gibt es noch keine Veröffentlichungen, die das Expressionsmuster von Serotoninrezeptoren und des Transporters gezielt im Lungenhomogenat von COPD-Patienten untersucht haben. Es existieren jedoch Studien, die mit Hilfe von Zellkulturexperimenten eine erhöhte Expression von 5-HTR_{2A} und 5-HTT in Thrombozyten von COPD-Patienten beschreiben [170, 191]. In passiv berauchten Ratten wurde zudem eine erhöhte Expression von 5-HTR_{2A} in bronchialen glatten Muskelzellen festgestellt [196]. Somit wird das Ergebnis der erhöhten Expression des Serotoninrezeptors 5-HTR_{2A} von bereits vorhandenen Zellkulturexperimenten unterstützt. In Bezug auf den Serotonintransporter sind die Ergebnisse zu vorherigen Untersuchungen kontrovers, werden jedoch von einer Studie gestützt, in der eine Rolle des 5-HTT in Rauch-induzierten Erkrankungen ausgeschlossen wird [192]. Zusätzlich muss eine eingeschränkte Vergleichbarkeit von Zellkulturexperimenten mit der Verwendung eines intakten Gewebeverbandes, in dem eine Reihe von Zellinteraktionen stattfinden, berücksichtigt werden. Um zu überprüfen, ob die Expression der Serotonin-Rezeptoren und des Serotonin-Transporters in humanen COPD-Lungen mit der Expression in den Mäuslungen des Rauch-induzierten Mausmodells vergleichbar ist, wurde ebenfalls die Genexpression im Lungenhomogenat von 3- und 8-Monate Rauch-exponierten Mäusen untersucht. Mäuse, die einer 3-monatigen Rauch-Exposition ausgesetzt waren, zeigten kein verändertes Expressionsmuster der beiden Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} und des Transporters 5-HTT verglichen mit nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen. Interessanterweise konnte nach 8 Monaten Rauch-Exposition eine signifikant erhöhte mRNA- und Protein-Expression von 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} im Vergleich zu Kontrollmäusen festgestellt werden (Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4a, b). Auch nach 8 monatiger Rauch-Exposition kam es zu keiner veränderten mRNA- und Protein-Expression des 5-HTTs (Abbildung 4.3b und Abbildung 4.4c). Die

Expressionsmuster im Lungenhomogenat der 8 Monate Rauch-exponierten Mäuse decken sich somit mit den Analysen aus COPD-Patienten. Vorherige Studien konnten zeigen, dass die Ergebnisse am Besten mit 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen zu vergleichen sind, da diese einem COPD-Patienten im GOLD-II-Stadium sehr ähnlich sind [221]. Aus den vorliegenden Resultaten und der diskutierten Literatur kann also geschlossen werden, dass die beiden Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} bedeutend für die Pathogenese der COPD sein könnten und dass das gewählte Mausmodell zum Rauch-induzierten Lungenemphysem vergleichbare Erkenntnisse über die Pathogenese des humanen Lungenemphysems liefern kann.

5.3 Präventive Behandlung mit Tergurid im Rauch-induzierten Lungenemphysemmodell der Maus

Aufbauend auf die Ergebnisse, die zeigten, dass Rauch zu einer Dysregulation der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} führte, wurde im folgenden Teil der Doktorarbeit untersucht, ob eine präventive Inhibition der beiden Rezeptoren vor einer Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems und der pulmonalen Hypertonie in Mäusen schützen kann. Als Inhibitor wurde den Mäusen Tergurid präventiv verabreicht. In Japan ist Tergurid für die Behandlung von Ovulationsstörungen und Hyperprolaktinämie klinisch zugelassen. Hierbei wird jedoch die agonistische Wirkung auf den Dopamin D₂-Rezeptor in der Hypophyse ausgenutzt, was zu einer Hemmung der Freisetzung von Prolaktin führt. Durch eine Behandlung mit Tergurid von Patienten mit Ovulationsstörungen und Hyperprolaktinämie oder in klinischen Studien zur Behandlung von Fibromyalgie traten nur wenige Nebenwirkungen (leichte Übelkeit, Erbrechen oder Schwindel) auf, welche meistens durch dopaminerge Effekte bedingt werden. Des Weiteren verursacht Tergurid keine Organschäden, da alle Effekte nach dem Absetzen der Substanz reversibel sind. Psychische Nebenwirkungen sind eher als gering einzuschätzen und sind ebenfalls reversibel [208, 209, 214]. In Studien mit Arterien aus Rattenschwänzen und Schweinelungen konnte gezeigt werden, dass Tergurid im Vergleich zu den meisten Ergolinderivaten, wie Ergotamin, Pergolin oder Bromocriptin ein starker 5-HTR_{2A}- und 5-HTR_{2B}-Rezeptorantagonist ist [250, 251]. Des Weiteren wurde die anti-serotonerge Eigenschaft von Tergurid auf diese Rezeptoren in Blutgefäßen, Thrombozyten und interstitiellen valvulären Zellen gezeigt [163]. Somit könnte Tergurid als eine potenzielle neue Therapie für COPD-Patienten fungieren, wenn die Mausdaten auf den Menschen übertragbar sind.

5.3.1 Überlebensrate und Veränderung des Körpergewichts der Mäuse

Während des kompletten Verlaufs der Studie wurden keine Todesfälle bei den Mäusen beobachtet (Abbildung 4.5), so dass Tergurid als eine für Mäuse nicht toxische Substanz beschrieben werden kann. In keiner der Versuchsgruppen traten ersichtliche Nebenwirkungen auf. Alle Mäuse zeigten ein unauffälliges Allgemeinbefinden, ein normales Erscheinungsbild (z.B. Zustand des Felles), eine normale Futter- und Wasseraufnahme, sowie ein physiologisches Putz- und Sozialverhalten [215]. Auch aus humanen klinischen Studien mit Tergurid zur Behandlung von Ovulationsstörungen, Hyperprolaktinämie und Fibromyalgie sind nur wenige Nebenwirkungen bekannt [208, 209]. Es wurde leichte Übelkeit, Erbrechen und Schwindel beobachtet [209]. Symptome wie Erbrechen können jedoch bei Mäusen nicht festgestellt werden, da ihnen die dafür entsprechende Magenmuskulatur fehlt [244]. Anzeichen wie Taumeln, welche auf Schwindel hinweisen könnten, konnten auch nicht beobachtet werden. Im Allgemeinen sind Nager weniger empfindlich auf gastrointestinale Effekte (wie z.B. Übelkeit) durch Dopamin und repräsentieren in dieser Hinsicht nicht die Situation beim Menschen [215]. Vorherigen Studien, in denen der Effekt von Tergurid auf eine Entwicklung von z.B. pulmonaler Fibrose in Mäusen oder pulmonaler Hypertonie in Ratten untersucht wurde, beschrieben Tergurid ebenfalls als eine gut verträgliche Substanz [197, 205]. Neben der Überlebensrate stellte die Kontrolle des Gewichtes ein weiteres Kriterium für die Verfassung der therapierten Mäuse dar (Abbildung 4.6). Rauch-exponierte Placebo-behandelte Mäuse zeigten nach 7 Wochen bis zum Therapieende nach 8 Monaten ein im Mittel signifikant geringeres Gewicht als die nicht-Rauch-exponierten Tiere. Dieser reduzierte Gewichtsverlauf kann z.B. durch den systemischen Effekt von Zigarettenrauch auf den Organismus erklärt werden. Viele COPD-Patienten, meist im GOLD Stadium III-IV, zeigen einen erheblichen Gewichtsverlust und eine Dysfunktion der Skelettmuskulatur resultierend in Muskelschwäche, sowie einem Muskelabbau [52, 56]. Bei den Mäusen konnte jedoch kein plötzlich eintretender rapider Gewichtsverlust beobachtet werden. Dies könnte darauf beruhen, dass Mäuse des Rauch-induzierten Modells nur milde strukturelle und mechanische Veränderungen in der Lunge entwickeln [224, 225]. Eine Applikation von Tergurid erhöhte teilweise das mittlere Gewicht der Rauch-exponierten Mäuse im Vergleich zu den Placebo-behandelten Mäusen und bestätigte die gute Verfassung der therapierten Tiere. Einen ähnlichen Gewichtsverlauf konnte in einem Versuch zum Effekt von Tergurid auf die Entstehung einer PH in Ratten aufgezeigt werden [252].

5.3.2 Arterieller Sauerstoff-Partialdruck und Hämatokrit

30 bis 70 % aller COPD-Patienten leiden unter einer milden pulmonalen Hypertonie [253]. Viele Studien erklärten die in COPD beobachteten pulmonal-vaskulären Veränderungen mit einer alveolären Hypoxie. Neueste Studien konnten jedoch zeigen, dass Rauch-exponierte Mäuse eine pulmonale Hypertonie entwickelten, obwohl sie nicht unter einer alveolären Hypoxie oder Hypoxämie gelitten hatten [221]. Zudem wurde auch bei COPD-Patienten, die keinen Sauerstoffmangel aufwiesen, die Entwicklung einer PH beschrieben [254]. Um eine mögliche hypoxische Veränderung der Rauch-induzierten Mäuse dieser Studie ausschließen zu können, wurde am Versuchsende der Sauerstoff-Partialdruck (pO_2) im Blut bestimmt (Abbildung 4.7a). Es konnte weder in der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Gruppe noch in der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Gruppe eine Veränderung des mittleren arteriellen Sauerstoff-Partialdruck (pO_2) festgestellt werden, so dass diese Ergebnisse im Einklang mit der Aussage sind, dass die Entwicklung der PH direkt durch den Einfluss von Zigarettenrauch auf das Lungengefäßsystem entsteht [60, 221, 255, 256]. Des Weiteren widerlegen diese Ergebnisse die bisher klassische Erklärung für die Entstehung der pulmonalen Gefäßveränderungen. Frühere Studien postulierten, dass durch alveoläre Hypoxie, Gefäßverlust und erhöhtem intrathorakalen Druck in Verbindung mit Lungenemphysem die pulmonal-vaskulären Veränderungen antreiben [255].

Die Messung des Hämatokrits wurde bei allen Mäusen des Rauch-induzierten Emphysem-Modells durchgeführt (Abbildung 4.7b). Placebo-behandelte Rauch-exponierte und Tergurid-behandelte Rauch-exponierte Mäuse zeigten einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits im Vergleich zu den nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen. Jedoch verringerte die Behandlung mit Tergurid den Hämatokrit der Mäuse im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren. Eine Erhöhung des Hämatokrits kann durch Sauerstoffmangel hervorgerufen werden. Unter hypoxischen Bedingungen kann es zu einer initial einsetzenden Diurese kommen, welche zu einer Flüssigkeitsausschwemmung des Plasmawassers führt. Folglich kommt es zu einer Bluteindickung (ansteigender Hämatokrit), um die Sauerstofftransportkapazität zu erhöhen [257-259]. Der Hämatokritanstieg in Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen kann jedoch nicht durch eine Hypoxie-induzierte Diurese erklärt werden, da die Mäuse keinen Abfall im arteriellen pO_2 aufwiesen [221]. Alternativ wird postuliert, dass der im Rauch enthaltene CO-Gehalt zu einer Steigerung der Erythropoietin-Spiegel führt, gefolgt von einer gesteigerten Bildung und Entwicklung der Erythrozyten (Erythropoese) [260]. Es konnte in dem hier angewandten Maus-Modell zum

Rauch-induzierten Lungenemphysem gezeigt werden, dass die Mäuse in der Rauchkammer einer erhöhten CO-Konzentration ausgesetzt waren und zudem einen erhöhten COHb-Wert (Anteil des im Blut mit CO belegten Hämoglobins) hatten [221]. Darüber hinaus kann ein erhöhter Hämatokrit aus einer nicht hypoxie-abhängigen HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) - Stabilisierung resultieren, da HIF Erythropoietin, das die rote Blutzellzahl steuert, reguliert [261-263].

5.3.3 Einfluss der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Entwicklung eines Lungenemphysems in Mäusen

Wie schon erwähnt, zeigt das hier angewandte Langzeit-Rauchmodell vaskuläre und alveoläre Veränderungen, die auch bei COPD-Patienten zu finden sind. Um den Effekt von Tergurid auf die Entwicklung des Rauch-induzierten Lungenemphysems zu untersuchen, wurden Mäuse für 8 Monate beraucht und präventiv zweimal täglich mit 1mg/kg Tergurid oder mit Placebo-behandelt. Wie auch schon in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, [221] wiesen Placebo-behandelte Rauch-exponierte Mäuse deutliche Veränderungen der funktionellen Parameter resultierend in einer signifikant erhöhten Compliance (Abbildung 4.8a) und in einem signifikant erniedrigten Atemwegswiderstand (Resistance) (Abbildung 4.8b) auf. Eine erhöhte Compliance spiegelt einen Verlust an Lungenelastizität wider, welcher durch einen Abbau von elastischen Fasern und einer Zerstörung der extrazellulären Matrix im Lungenparenchym erklärt wird. Es entstehen große Lufträume in der Lunge, die sich bei Inspiration ausdehnen. Da die Oberflächenspannung der Alveolen sich stark verringert, können sie sich bei der anschließenden Expiration nicht wieder zusammenziehen und die Atemluft bleibt somit in der Lunge eingeschlossen (*air trapping*). Es kommt zu einer Hyperinflation der Lunge [54, 59, 228, 229]. Ein weiteres Merkmal in COPD-Patienten ist der erhöhte Atemwegswiderstand, welcher sich jedoch im Mausmodell umgekehrt verhält und abnimmt [242]. Diese Divergenz wird durch die Unterschiede der Luftwegsanatomie bei Mäusen in Kombination mit deutlich geringerer end- und expiratorischer Schließung der terminalen Atemwege erklärt [228, 229]. Tergurid-behandelte Rauch-exponierte Mäuse zeigten im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen eine signifikant niedrigere Compliance (Abbildung 4.8a) und eine höhere Resistance (Abbildung 4.8b), die den Werten der nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen ähneln. Eine weitere Quantifizierbarkeit des Rauch-induzierten Emphysems in Mäusen stellt die morphometrische Analyse des prozentualen Gesamtluftraums der Alveolen (*airspace*), des mittleren Abstands zwischen Alveolarsepten (*mean linear intercept*, MLI) und der Septendicke (*septal wall*

thickness) dar. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Entstehung eines Lungenemphysems durch einen erhöhten *Airspace*, einen erhöhten *MLI* und eine verringerte Septendicke charakterisiert ist [59, 221, 264]. Im Zuge dieser Arbeit konnte ein signifikant erhöhter *Airspace* und *MLI* in Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen festgestellt werden, jedoch überraschenderweise keine verringerte Septendicke. Letzteres kann anhand der vorliegenden Daten aktuell nicht erklärt werden. Tergurid-behandelte Rauch-exponierte Tiere wiesen hingegen einen deutlich niedrigeren *Airspace* auf (Abbildung 4.9). In Anbetracht der reduzierten Compliance, des erhöhten Atemwegswiderstands, des niedrigeren *Airspaces* und der repräsentativen histologischen Bilder zur morphometrischen Analyse von Lungenschnitten (Abbildung 4.10), scheint eine präventive Behandlung mit Tergurid die Rauch-induzierte Entwicklung eines Emphysems in Mäusen zu verhindern. Der genaue protektive Mechanismus von Tergurid auf die Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems wurde bisher noch nicht untersucht.

Einige Studien beschrieben, dass eine Bindung von 5-HT an den Rezeptor 5-HTR_{2B} eine erhöhte Elastase-Aktivität und eine gesteigerte TGF- β -Synthese in der Entwicklung einer PH vermittelt [146, 265]. Es ist bekannt, dass Elastasen das Lungengewebe proteolytisch abbauen und somit zur Ausbildung eines Emphysems führen können [51-54]. Die Arbeitsgruppe in welcher die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, konnte in einer Studie zur Rauch-induzierten Entwicklung eines Emphysems an Mäusen zeigen, dass eine Rauch-Exposition zu einer Reduktion und Degradierung von elastischen Fasern im Lungengewebe führt [221]. Eine durch 5-HTR_{2B} induzierte höhere Elastase-Aktivität könnte somit in einer Veränderung der elastischen Fasern resultieren und zur Entstehung eines Emphysems beitragen. Spekulativ könnte so der protektive Effekt von Tergurid auf das Rauch-induzierte Emphysem mit dem Serotonin-Rezeptor 5-HTR_{2B} in Verbindung gebracht werden. Eine Inhibition des 5-HTR_{2B} durch Tergurid könnte die durch den Rezeptor induzierte erhöhte Elastase-Aktivität und den damit verbundenen proteolytischen Abbau des Lungengewebes verhindern, so dass die Entstehung des Rauch-induzierten Emphysems gehemmt wird. Weiter kann hypothetisiert werden, dass die durch 5-HTR_{2B} gesteigerte TGF- β -Synthese eine Rolle bei der Emphysementwicklung übernehmen könnte. Ein Polymorphismus des TGF- β -Gens wurde mit der Entwicklung mit COPD assoziiert [30, 44]. Studien konnten zeigen, dass oxidativer Stress eine Inflammation verstärken kann, indem der pro-inflammatorische Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) aktiviert wird, der wiederum inflammatorische Mediatoren, wie TGF- β , reguliert und somit die eigene Immunantwort weiter verstärkt [85, 86]. Des Weiteren führt Serotonin über den 5-HTR_{2B} zu einer

Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*), die über Phosphorylierungskaskaden die Steuerung der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation und Zelltod übernehmen [162]. Studien konnten zeigen, dass Serotonin die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), eine MAP-Kinase, aktiviert. JNK wird zusätzlich über Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie EGF, PDGF, TGF- β und TNF, sowie zellulären Stress aktiviert, was Zellantworten wie Entzündung, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung zur Folge haben kann [162, 164]. Gerade eine Apoptose der alveolären Zellen in den Lungen von COPD-Patienten wird mit einer Emphysementwicklung assoziiert. Die durch 5-HTR_{2B}-induzierte gesteigerte TGF- β -Synthese [146] könnte somit die eigene Immunabwehr und die Apoptose der alveolären Zellen verstärken und zu emphysematösen Veränderungen führen, die durch eine präventive Applikation von Tergurid verhindert werden könnten.

5.3.4 Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie und den pulmonal-vaskulären Umbau (*Remodeling*)

Bisherige Studien konnten zeigen, dass 30 bis 70 % aller COPD-Patienten unter einer pulmonalen Hypertonie leiden und morphologische Veränderungen im Lungengefäßsystem aufweisen [253, 266, 267]. Um den Effekt von Tergurid auf die Entwicklung der Rauch-induzierten pulmonalen Hypertonie und den pulmonalen vaskulären Umbau (*Remodeling*) zu analysieren, wurden die Mäuse nach der 8 monatigen Rauch-Exposition und paralleler Medikation von Tergurid oder Placebo physiologisch und morphometrisch untersucht. Eine Ermittlung des mittleren SAPs der einzelnen Versuchsgruppen zeigte keinen eindeutigen Unterschied

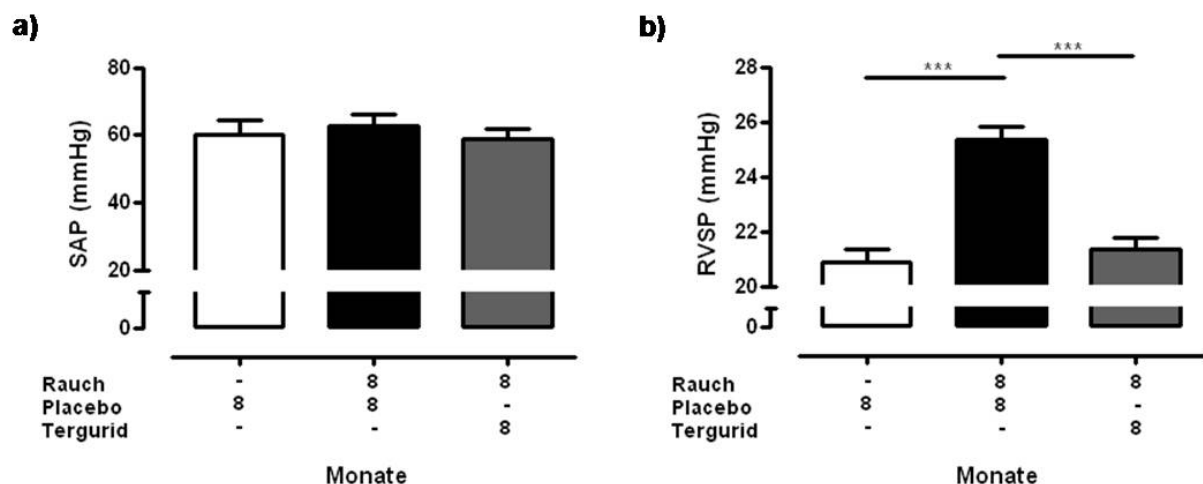


Abbildung 4.11a), so dass daraus geschlossen werden kann, dass Tergurid keine systemische vasodilatative Wirkung auf den Organismus der Maus hat. In Analogie zu vorherigen Studien

zur Rauch-exponierten PH an Mäusen [221] wiesen die Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse einen signifikant erhöhten RVSP (

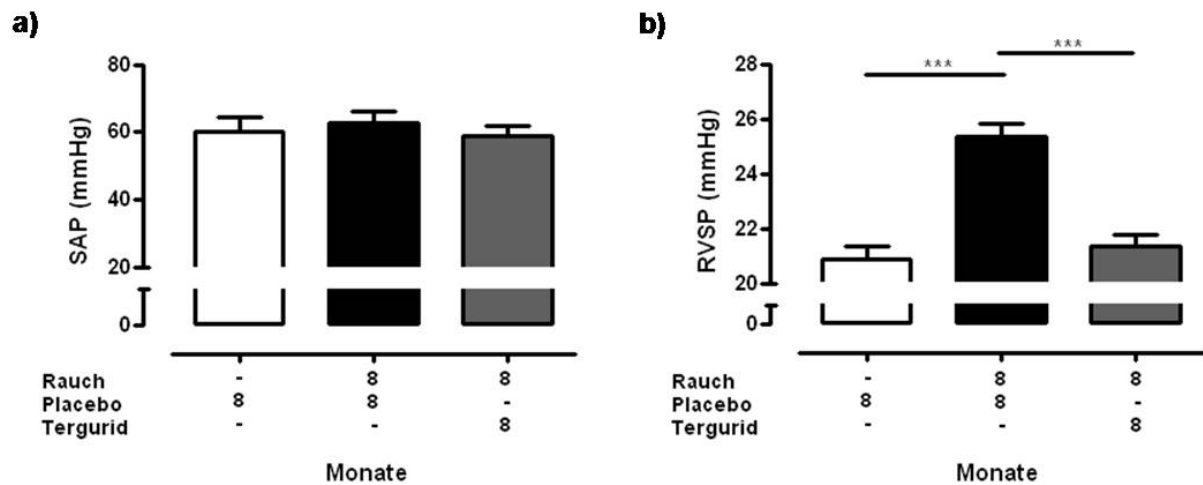


Abbildung 4.11b) gefolgt von einer Rechtsherzhypertrophie (Abbildung 4.12) auf und zeigten einen deutlich Anstieg des Muskularisierungsgrades der kleinen Gefäße (Durchmesser 20-70 μ M) (Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14). Tergurid-behandelte Rauch-exponierte Mäuse zeigten im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen einen signifikant niedrigeren RVSP (

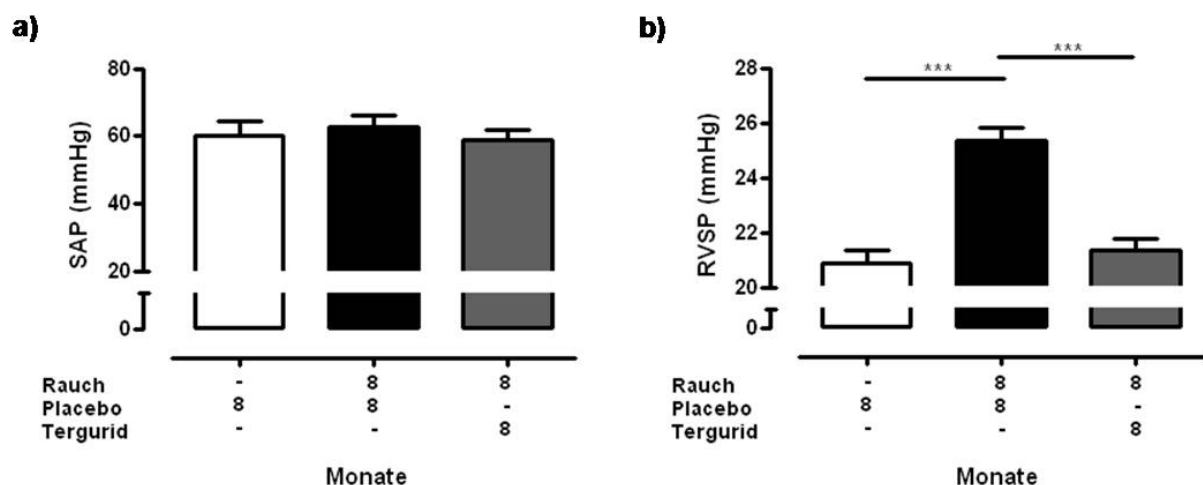


Abbildung 4.11) und eine verminderte Rechtsherzhypertrophie (Abbildung 4.12). Des Weiteren verhinderte Tergurid einen Anstieg der Muskularisierung in den kleinen Gefäßen (Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14). In einer Studie zur MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie in Ratten konnten ähnliche Effekte von Tergurid gezeigt werden [197] und bestätigt den protektiven Einfluss von Tergurid auf eine Rauch-induzierte PH und dem vaskulären *Remodeling*.

Derzeit gibt es mehrere Studien, die eine Dysregulation der beiden Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} mit der Pathogenese einer pulmonalen Hypertonie in Verbindung

bringen [119, 193, 197, 268-271]. Ein bedeutendes Merkmal einer PH ist eine übermäßige Vasokonstriktion der Gefäße [54, 60, 61, 193]. Eine Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie könnte durch folgenden Mechanismus erklärt werden: es ist bekannt, dass Zigarettenrauch zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen kann, was eine erhöhte Ausschüttung von Serotonin aus den Thrombozyten zur Folge hat [178]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Zigarettenrauch die MAO (Monoaminoxidase)-Aktivität in der Lunge inhibiert, resultierend in einem gehemmten Abbau von Serotonin [199, 272-274]. Eine Kombination der beiden Prozesse führt zu einer erhöhten Serotoninkonzentration im Plasma, so dass ein vermehrtes Binden von Serotonin an den vaskulären Rezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} in einer gesteigerten Aktivierung resultiert [179]. Diese Rezeptoren der Familie 2 (5-HTR₂) sind an G_q-Proteine (aktivieren Phospholipase C-β) gekoppelt [134] und führen über Signalkaskaden zu einer intrazellulären Erhöhung von Ca²⁺. In glatten Muskelzellen kommt es durch die hohen Ca²⁺-Konzentrationen zu einer Kontraktion der Zelle [65, 155, 156]. Eine stetige Kontraktion der Gefäße führt zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes und zu einem damit verbundenen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf, der in den meisten Fällen in einer Rechtsherzhypertrophie endet [54, 59-61, 179]. Eine Rechtsherzhypertrophie konnte in den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen nach 8 Monaten beobachtet werden (Abbildung 4.12c). Eine Rechtsherzhypertrophie kann zudem durch das Rauch-induzierte Lungenemphysem verstärkt werden. In einem solchen Fall kommt es zu einem erhöhten pulmonal-arteriellen Druck in den pulmonalen Gefäßen, die aufgrund des zerstörten Lungenparenchyms nicht offen gehalten werden [57, 254, 256]. Durch den Einsatz des 5-HTR_{2A}- und 5-HTR_{2B}-Inhibitors Tergurid könnte die Serotonin-vermittelte Kontraktion der glatten Muskelzellen in den Gefäßen reduziert sein, was sich in einem niedrigeren RVSP und einer verringerten Rechtsherzhypertrophie der Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäuse widerspiegelt (

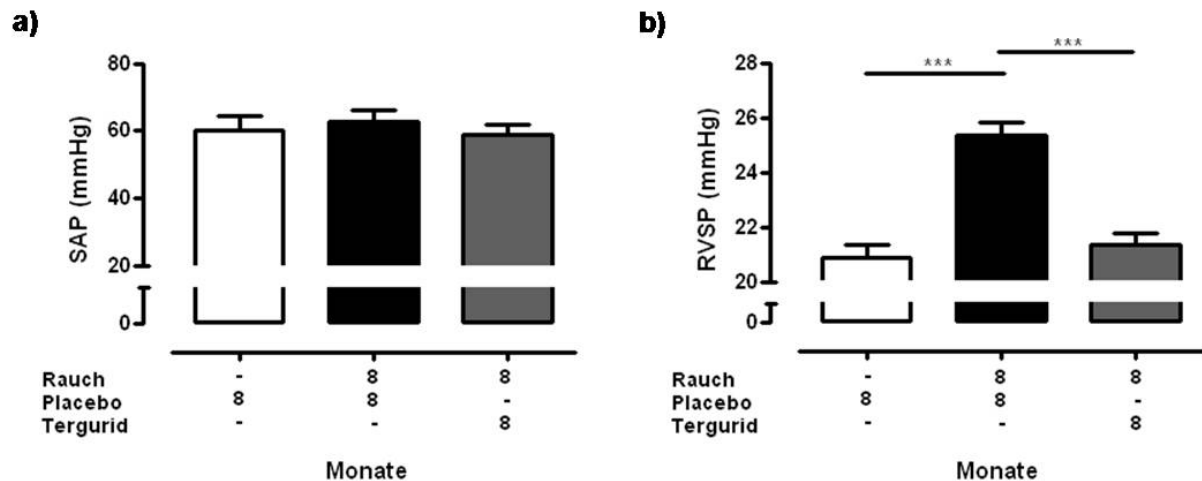


Abbildung 4.11b und Abbildung 4.12c). Es gibt Studien, die postulieren, dass vor allem der 5-HT_{2A}-Rezeptor für die pulmonale Vasokonstriktion verantwortlich ist [197, 275, 276]. Ein weiteres Charakteristikum einer Rauch-induzierten PH ist das pulmonalvaskuläre *Remodeling* [221], was sich hauptsächlich durch eine Verdickung der *Tunica media* aufgrund einer Hyperplasie der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen auszeichnet [54, 59-61]. Studien konnten zeigen, dass Serotonin vor allem über den 5-HT_{2B} die Proliferation von glatten Muskelzellen induziert [146, 180, 265], zu Entzündungen und Thrombosen der Gefäße beiträgt [181] und somit das *Remodeling* vermittelt. Der genaue Signalweg des mitogenen Effektes von Serotonin auf die Zelle konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. Hypothetisch könnte dieses mit der Serotonin-induzierten Aktivierung der MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*) assoziiert werden, die wichtige Komponenten des Signalweges zur Steuerung der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation und Zelltod sind [162]. Es wurde beschrieben, dass vor allem ERK (*extracellular signal-related kinases*) zur Zellproliferation führt [163]. Diese Zellproliferation könnte eine verstärkte Muskularisierung der Pulmonalarterien verursachen [197, 205, 277]. Eine erhöhte Muskularisierung der kleinen Gefäße konnte mit Hilfe einer morphometrischen Analyse in den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen beobachtet werden, jedoch nicht in den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen (Abbildung 4.13c). Die repräsentativen histologischen Bilder zur vaskulären Morphometrie verdeutlichen die Ergebnisse zur Muskularisierung der Gefäße (Abbildung 4.14).

Ein weiteres Merkmal für eine vaskuläre Veränderung in Patienten mit COPD und in dem Rauch-induzierten Emphysemmodell an Mäusen ist der Verlust von kleinen Gefäßen [221]. Auch in dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass sich die Ratio Alveolen zu Gefäßen in Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen in Richtung Alveolen verschoben hat und somit einen stärkeren Verlust an Gefäßen gegenüber Alveolen reflektiert (Abbildung 4.15).

Eine aktuelle Studie der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, konnte zeigen, dass der Gefäßumbau und die pulmonale Hypertonie einer alveolären strukturellen und funktionellen Veränderung in Bezug auf das Rauch-induzierte Emphysem vorausgeht [221]. Aufgrund des Gefäßverlusts könnte es so zu einer Unterversorgung der Alveolen kommen, die daraufhin absterben. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem von Studien beschriebenen direkten Einfluss von Zigarettenrauch auf das Lungengefäßsystem und den Gefäßwiderstand [60, 255, 256, 278]. Hypothetisch könnte auch eine erhöhte Anzahl von inflammatorischen Zellen in der *Adventitia* der pulmonalen muskulären Arterien eine Rolle spielen. Dabei entsteht eine Entzündungsreaktion, die von aktivierten T-Lymphozyten, vorwiegend CD8⁺ T-Zellen, erzeugt wird und in einer Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen vaskulären Relaxation und der Verdickung der *Intima*-Schicht resultiert. Eine beobachtete erhöhte CD8⁺-T-Zell-Infiltration der pulmonalen Arterien von Rauchern ohne Atemwegsobstruktion unterstützt diese Hypothese und deutet auf Rauch-induzierte entzündliche Mechanismen hin, die gerade in den frühen Stadien der COPD für die Entwicklung der strukturellen und funktionellen Veränderungen der pulmonalen Durchblutung verantwortlich sein könnten [256]. In den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen konnte keine Verschiebung der Ratio von Alveolen zu Gefäßen beobachtet werden und somit auch kein Gefäßverlust (Abbildung 4.15). Spekulativ könnte Tergurid eine zusätzliche anti-inflammatorische Eigenschaft zugeschrieben werden. Zusammenfassend hat Tergurid eine schützende Wirkung auf die Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie und das pulmonale Gefäß-*Remodeling*, welche durch Beeinflussung verschiedener zellulärer Prozesse bedingt sein könnte.

5.3.5 Wirkung der präventiven Behandlung mit Tergurid auf die Serotonin-Konzentration im Plasma von 8 Monate Rauch-exponierten Mäusen

In Arbeiten anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Rauchen-induzierten Ausschüttung von Serotonin aus den Thrombozyten bei Menschen kommt, sobald Nikotin in den Blutkreislauf eintritt [184, 231]. In Patienten mit COPD konnte ein erhöhter Spiegel an Serotonin im Plasma nachgewiesen werden [186]. Um nun die Konzentration an Serotonin im Plasma der Rauch-exponierten Mäuse und den Effekt des Serotonin-Inhibitors Tergurid auf die Serotonin-Konzentration zu ermitteln, wurde die Serotonin-Konzentration im Plasma der Mäuse am Ende des Versuches bestimmt.

Kontrovers zu den bisherigen Beobachtungen einer erhöhten Serotonin-Konzentration im Plasma von COPD-Patienten wurde in Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen ein

niedrigerer Serotonin-Gehalt im Vergleich zu den nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen festgestellt. Eine präventive Gabe von Tergurid zeigte in dieser Versuchsgruppe einen erhöhten Serotoningehalt im Plasma im Vergleich zu den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen, der dem Wert der Kontrollmäuse ähnlich war (Abbildung 4.16).

Bisherige Theorien zu der erhöhten Serotonin-Konzentration im Plasma von COPD-Patienten verknüpften diesen Serotonin-Anstieg mit einem Zusammenspiel mehrerer Mechanismen. Der genaue treibende Einfluss konnte aber noch nicht geklärt werden. Es wurde postuliert, dass ein gestörter regulatorischer Prozess von Serotonin in Bezug auf die Speicherung, Ausschüttung, Wiederaufnahme oder dessen Spaltung zu einer erhöhten Konzentration im Plasma und in den Blutgefäßen der Lunge führt und somit in die Pathogenese von COPD involviert sein könnte [186, 198, 199]. Des Weiteren gibt es Studien, die eine erhöhte Serotonin-Konzentration im Plasma mit dem Serotonin-Transporter in Verbindung bringen. Die Rolle des Transporters bezieht sich auf die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem Plasma in die Thrombozyten, was bei einer erhöhten Konzentration an Serotonin im Plasma folglich eine intrazelluläre Erhöhung von Serotonin mit sich bringt. Diese erhöhte intrazelluläre Konzentration könnte durch eine Feedback-Antwort zu einer Modifizierung des Serotonin-Transporters führen und die Aufnahme von Serotonin in die Thrombozyten verringern. Eine Inhibition der 5-HT Wiederaufnahme könnte somit eine Erklärung für die erhöhte 5-HT Konzentration im Plasma von COPD-Patienten sein [185, 186]. Weitere Studien beschreiben, dass der im Tabakblatt enthaltene bzw. künstlich zugesetzte Zucker beim Rauchen verbrennt und so Acetaldehyd entsteht. Acetaldehyd wirkt reduzierend auf das Enzym MAO-B (Monoaminoxidase B), das im Gehirn normalerweise die Neurotransmitter Serotonin abbaut. Eine Folge daraus ist in diesem Falle ein erhöhter Serotonin-Spiegel im Gehirn [182]. Alle diese Theorien konnten mit den in dieser Arbeit ermittelten Serotonin-Konzentrationen im Plasma nicht bestätigt werden.

In Anbetracht der Ergebnisse könnten neue Hypothesen aufgestellt werden:

1) Eine niedrigere Serotonin-Konzentration im Plasma von Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu Placebo-behandelten nicht-Rauch-exponierten Tieren könnte zum Beispiel mit der Tatsache erklärt werden, dass Serotonin vermehrt an die Rezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} bindet und/oder durch den Serotonin-Transporter in die Zelle aufgenommen wurde, so dass sich die Konzentration im Plasma verringert hat. Eine erhöhte Expression des Serotonin-Transporters konnte in dieser Arbeit im Lungenhomogenat zwar nicht festgestellt werden (Abbildung 4.3b und Abbildung 4.4c), jedoch in den gewebsspezifischen Analysen von Gefäßen und Alveolar-Septen (Abbildung 4.17), so dass

der Transporter durchaus eine Rolle bei der verminderten Serotonin-Konzentration im Plasma von Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen spielen könnte. Des Weiteren stellen die Lunge und die Leber die massgebenden Organe für die Clearance von Serotonin aus der Blutzirkulation dar, wobei der Transporter die ausschlaggebende Rolle übernimmt, obwohl die Rezeptoren eine höhere Affinität für Serotonin haben. Ausgeschlossen werden müsste in diesem Fall jedoch die beschriebene Feedback-Antwort, die zu einer Modifizierung des Transporters führen könnte und diesen so inaktiviert [185, 186]. Ausgehend von dieser Hypothese würde sich das beobachtete Phänomen einer gesteigerten Plasma-Konzentration durch eine präventive Applikation von Tergurid auch erklären lassen. Durch die spezifische Inhibition der Rezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} durch Tergurid kann Serotonin nicht mehr an die Rezeptoren binden, wodurch sich dessen Konzentration im Plasma erhöht. Ein zusätzliches Indiz für diese Hypothese könnte die Tergurid-induzierte verminderte Expression des 5-HTTs in den gewebspezifischen Analysen sein (Abbildung 4.17). Um allerdings diese Hypothese bestätigen zu können, müssten weiterführende Analysen zur Serotoninkonzentration innerhalb der Zellen durchgeführt werden, die jedoch nicht in dieser Arbeit analysiert werden konnten. Studien an Mäusen zur Hypoxie-induzierten erhöhten Serotonin-Konzentration im Plasma zeigten, dass sowohl 5HTR_{2B} Knock-out Mäuse als auch mit einem 5-HTR_{2B}-Antagonist behandelte Mäuse keinen reduzierten Gehalt an Serotonin im Plasma aufwiesen [146, 279]. Dies könnte die erhöhte Serotoninkonzentration in Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen bestätigen.

2) Eine weitere Hypothese zu dem niedrigeren Serotonin-Gehalt im Plasma von Rauch-exponierten Tieren könnte ein Rauch-induzierter erhöhter Abbau von Serotonin durch MAO sein. Studien konnten beobachten, dass es in berauchten Ratten zu keinem höheren Serotonin-Spiegel in der Lunge oder in BAL-Flüssigkeit gekommen ist. Sie verknüpften diese Beobachtungen mit einer erhöhten MAO-A Aktivität in der Lunge. Des Weiteren wurde postuliert, dass durch eine gesteigerte MAO-A-Aktivität in der Lunge die Rauch-induzierte Bildung von Superoxid beschleunigt wird und so bei der Pathogenese von COPD beteiligt sein könnte [240]. Es kann spekuliert werden, dass eine Rauch-induzierte erhöhte Expression von den Serotonin-Rezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} die Aktivität der MAO-A verstärken könnte. Somit könnte es zu einer erhöhten Bildung von Superoxid kommen. Um diese Hypothese bestätigen zu können, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

3) Eine dritte Hypothese zu den kontroversen Plasma-Serotonin-Konzentrationen von Rauch-induzierten Mäusen und COPD-Patienten könnte der Unterschied des in dieser Arbeit angewandten Models zur Rauch-induzierten Entwicklung eines Emphysems im Vergleich zu

COPD-Patienten sein. Mäuse dieses Modells zeigen durchaus mit COPD-Patienten vergleichbare alveolare und vaskuläre Veränderungen der Lunge, dennoch erreichen sie lediglich das GOLD-II Stadium [224, 225]. Es ist nicht auszuschließen, dass sich der Serotonin-Gehalt im Plasma im Verlaufe der COPD-Erkrankung verändert. So könnte es sein, dass COPD-Patienten, die sich im GOLD-Stadium II befinden, keine erhöhten Serotonin-Konzentrationen im Plasma aufweisen, sondern diese erst in den schweren Stadien der COPD auftreten. Um diesen Aspekt verifizieren zu können, müssten die Serotonin-Konzentrationen im Plasma in Abhängigkeit mehrerer Zeitpunkte der einzelnen COPD-GOLD-Stadien untersucht werden. Derzeit gibt es noch keine publizierten Studien zu dieser Hypothese.

Um Anhaltspunkte über den molekularen Mechanismus des präventiven Effektes des Inhibitors Tergurid zu erhalten, wurde sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun auf potentiell involvierte Signalwege fokussiert.

5.3.6 Kompartiment-spezifische Expression der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) nach präventiver Behandlung mit Tergurid und 8-monatiger Rauch-Exposition

Um den Wirkmechanismus der präventiven Applikation von Tergurid auf die Rauch-induzierte Entwicklung des Emphysems und der pulmonalen Hypertonie zu betrachten, wurde die Expression der Serotoninrezeptoren (5-HTR_{2A/2B}) und des Serotonintransporters (5-HTT) Kompartiment-spezifisch analysiert. Da eine Rauch-induzierte Emphysementwicklung mit einer Destruktion der alveolären Septen einhergeht und eine pulmonale Hypertonie verbunden mit einem vaskulären Remodeling der Gefäße assoziiert wird, wurden die pulmonalen Alveolar-Septen und Gefäße der einzelnen Versuchsgruppen aus Lungenquerschnitten dissektiert und auf mRNA-Ebene untersucht (Abbildung 4.17). Interessanterweise konnte in den Gefäßen (Abbildung 4.17a) der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu den nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen nur eine Tendenz zur Hochregulation der Rezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} beobachtet werden. Erstaunlicherweise zeigte jedoch der 5-HTT eine deutlich erhöhte Expression. Im Lungenhomogenat der Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäuse hingegen konnte eine erhöhte Expression der beiden Rezeptoren, aber nicht des Transporters gezeigt werden (Abbildung 4.3b). Eine präventive Behandlung der Rauch-exponierten Mäuse mit Tergurid hemmte signifikant die erhöhte Expression des Rezeptors 5-HTR_{2A} und des 5-HTTs in den Gefäßen (Abbildung 4.17a). Anhand der Expressionsergebnisse in den pulmonalen Gefäßen

könnte hypothetisiert werden, dass der Rezeptor 5-HTR_{2A} die Hauptrolle in der Entwicklung einer Rauch-induzierten pulmonalen Hypertonie in Verbindung mit einem vaskulären *Remodeling* übernimmt. Unterstützt wird diese Hypothese durch Publikationen zur Hypoxie-induzierten PH, welche zeigen, dass es durch einen hohen Serotoninspiegel zu einer 5-HTR_{2A}-Rezeptor-vermittelten pulmonalen Vasokonstriktion kommt, eine Aggregation von Thrombozyten gefördert wird [119, 160, 193, 275], sowie eine Veränderung (Polymorphismus) des 5-HTR_{2A} mit einer arteriellen PH in Verbindung gebracht wird [194]. Einige Studien konnten zeigen, dass es aufgrund einer erhöhten Aufnahme von Serotonin mittels des Transporters zu einer Hyperplasie der glatten Muskelzellen kommen kann [155, 156, 190]. Somit könnte auch der Transporter eine Rolle bei der Rauch-induzierte pulmonalen Hypertonie und dem vaskulären *Remodeling* übernehmen. In Anbetracht der Medikation mit Tergurid scheint der Effekt des Transports einem sekundären Mechanismus zugrunde zu liegen, der im Zuge dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte. Die erhöhte Expression des Transporters könnte zusätzlich ein Indiz für die verminderte Serotonin-Konzentration in den Placebo-behandelten Rauch-exponierten Tieren sein (Abbildung 4.16).

Im Gegensatz zu dem ermittelten mRNA-Expressionsmuster in den Gefäßen konnte in den pulmonalen Alveolar-Septen keine veränderte Regulation des Rezeptors 5-HTR_{2A} ermittelt werden. Interessanterweise zeigte die Placebo-behandelte Rauch-exponierte Gruppe eine Hochregulation des 5-HTR_{2B} verglichen mit der nicht-Rauch-exponierten Kontrollgruppe in den Septen. Die präventive Applikation von Tergurid scheint diese Regulation zu verhindern (Abbildung 4.17b), was die Hypothese nahelegt, dass vor allem der Rezeptor 5-HTR_{2B} eine wichtige Aufgabe bei der Entstehung des Rauch-induzierten Emphysems übernimmt. Wie schon in Abschnitt 5.3.3 erwähnt, könnte die Entstehung des Rauch-induzierten Emphysems der Placebo-behandelten Mäuse mit der 5-HTR_{2B}-vermittelten erhöhten Elastase-Aktivität und der gesteigerte TGF- β -Synthese erklärt werden [85, 86, 146, 162, 164, 265, 279]. Auch in den Alveolar-Septen Placebo-behandelter Rauch-exponierter Mäuse konnte im Vergleich zu den nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen eine erhöhte Expression des Serotonin-Transporters festgestellt werden. Dagegen war die Expression in Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen signifikant niedriger (Abbildung 4.17b).

Allgemein gibt es kontroverse Diskussionen über die Rolle des 5-HTTs in der COPD. Lerman *et al.* veröffentlichte eine Studie, in der die Rolle des 5-HTT in Rauch-induzierten Erkrankungen ausgeschlossen wird [192]. Im Kontrast zu dieser Studie konnte allerdings eine erhöhte Expression von 5-HTT in Thrombozyten von COPD-Patienten nachgewiesen werden [191]. Viele Studien verknüpfen den Einfluss des Transporters in COPD-Patienten mit einem

5-HTT Gen-Polymorphismus [187, 280]. In einem Hypoxie-Model zur pulmonalen Hypertonie konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von inflammatorischen Zytokinen zu einer Überexpression des 5-HTTs führt [281]. Die Rauch-vermittelte Inflammation könnte mit der Überexpression des 5-HTTs in den alveolären Septen in Verbindung gebracht werden. Derzeit gibt es jedoch noch keine Studie über den direkten Mechanismus/Einfluss des Serotonin-Transporters auf die Entstehung des Emphysems in COPD-Patienten. Alle Studien beschrieben lediglich eine 5-HTT-vermittelte Hyperplasie der Zellen [165, 190, 282], die einen großen Beitrag zur Entstehung der PH in COPD leistet [191].

Zusammenfassend liefern jedoch die Ergebnisse der Kompartiment-spezifischen Analyse aufschlussreiche Erkenntnisse über die Regulation der beiden Rezeptoren in der Pathogenese des Rauch-induzierten Emphysems assoziiert mit einer PH. Somit kann gefolgert werden, dass 5-HTR_{2A} die Hauptrolle bei den vaskulären und 5-HTR_{2B} bei den alveolären Veränderungen übernimmt. Dies verdeutlicht, dass der Einsatz von Tergurid die Pathogenese der Rauch-induzierten pulmonalen Veränderung gleich an mehreren Stellen günstig beeinflusst und daher als eine potenzielle Therapiemöglichkeit der COPD in Betracht gezogen werden sollte.

5.3.7 Expression von 3-Nitrotyrosin im Lungenhomogenat von präventiv behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauch-Exposition

Auf der Suche nach einem möglichen *downstream*-Wirkmechanismus des Serotonin-Inhibitors Tergurid rückte eine 3-Nitrotyrosin-Formation in den Fokus der nächsten Untersuchung. Aus der Literatur war bekannt, dass eine Fehlregulation der Nitrotyrosin-Bildung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von COPD in Menschen spielen kann [235, 236]. Durch Peroxynitrit können Proteine nitriert werden, so dass es zu einer Beeinträchtigung ihrer Funktion und Aktivität kommen kann. So kann dies zum Beispiel eine Apoptose einleiten und die Entwicklung eines Emphysems induzieren [283]. In Rauch-exponierten Mäusen kam es zu einer erhöhten NO-Produktion aufgrund einer gesteigerten iNOS-Aktivität [221]. Diese gesteigerte iNOS-Aktivität konnte sowohl in den Gefäßen als auch im Parenchym der Lunge nachgewiesen werden. NO reagiert mit Superoxid zu Peroxynitrit resultierend in einer erhöhten Nitrotyrosin-Bildung [221]. Zudem wurde eine NO-Freisetzung aus dem Endothel durch den 5-HTR_{2B} beschrieben [284], so dass die Möglichkeit besteht, dass es durch eine gesteigerte Expression 5-HTR_{2B} auch zu einer erhöhten NO-Produktion kommen kann, resultierend in einer erhöhten Nitrotyrosin-Bildung über den oben genannten Mechanismus. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in Placebo-

behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu nicht-Rauch-exponierten Kontrollmäusen eine signifikant erhöhte Nitrotyrosin-Bildung nachgewiesen werden (Abbildung 4.18). Obwohl die Nitrotyrosin-Bildung in Rauch-exponierten Mäusen und in COPD-Patienten eine bedeutende Rolle spielt, wurden noch keine Studien veröffentlicht, die eine Dysfunktion des serotonergen Systems mit einer gesteigerten Nitrotyrosin-Bildung in Verbindung gebracht haben [233, 235, 236], so dass es von großem Interesse war einen möglichen *downstream*-Link der beiden Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} zu der Nitrotyrosin-Bildung zu untersuchen. Weder in immunohistologischen Färbungen noch auf Proteinebene konnte jedoch in Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Mäusen im Vergleich zu Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen eine Reduktion der Nitrotyrosin-Bildung detektiert werden (Abbildung 4.18). Anhand dieser Versuche scheint Tergurid keinen direkten protektiven Effekt auf die Nitrotyrosin-Formation in Rauch-exponierten Mäusen zu haben. Dennoch kann ein Link zwischen den Serotonin-Rezeptoren und der Nitrotyrosin-Bildung nicht ausgeschlossen werden. Um diesen Signalweg zu untersuchen, könnte z.B. das Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptoren und des Transporters in iNOS Knock-out-Mäusen in neuen Untersuchungen analysiert werden. Des Weiteren könnten zelluläre Prozesse, wie Apoptose oder Proliferation, in Rauch-begasten Zellen oder in Zellen, die mit Rauchextrakt versetztem Medium behandelt werden, untersucht werden. Interessant wäre auch eine NO-Konzentrationsbestimmung in berauchten Zellen in Kombination mit einer Applikation von Tergurid.

5.4 Wirkung von Serotonin und Tergurid auf Zelltyp-spezifische Apoptose und Proliferation

Es ist bekannt, dass Serotonin neben vasoaktiven Effekten auch mitogene Einflüsse auf Zellen haben kann [146, 159-161, 165, 166], der genaue zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Daher war ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeit die Untersuchung möglicher Veränderungen der Apoptose und der Proliferation von Zellen durch eine Applikation von Serotonin und/oder Tergurid. Wie schon im Einleitungsteil beschrieben, ist eine Imbalance zwischen Apoptose und Proliferation der alveolären Zellen maßgeblich an der Entwicklung eines Emphysems beteiligt [20, 237-239].

Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass die beiden Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} in der humanen Lunge als auch in Lungenepithelzellen und Fibroblasten lokalisiert sind [247-249]. Eine Expression der beiden Rezeptoren wurde zusätzlich in den glatten

Muskelzellen und in den Endothelzellen des Lungengefäßsystems ermittelt [197, 285], so dass sich bei den Experimenten zu möglichen veränderten zellulären Prozessen auf murine Endothelzellen und Alveolarepithelzellen Typ II konzentriert wurde.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Serotonin die Apoptose in murinen Alveolarepithelzellen Typ II (AECII) induziert (Abbildung 4.19b), nicht aber in murinen Endothelzellen (Abbildung 4.19a). Eine Applikation von 1 nM und 1 µM Tergurid in Kombination mit 1 µM Serotonin verglichen mit den Serotonin behandelten AECII-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose-Rate (Abbildung 4.19b). Eine Medikation mit höheren Tergurid-Konzentrationen führte jedoch zu keiner weiteren Reduktion der Apoptose-Rate, so dass der anti-apoptotische Effekt von Tergurid konzentrationsabhängig ist. Eine Apoptose der alveolaren Zellen wurde mit einer Emphysementwicklung in COPD-Patienten assoziiert [35]. Bisher beschriebene Studien, dass der apoptotische Effekt von alveolaren Zellen in COPD-Patienten vor allem durch zytotoxische T-Lymphozyten oder durch eine Inhibition des VEGF-Rezeptors ausgelöst werden könnte [90, 93, 286, 287]. Die durch Serotonin ausgelöste Apoptose in Rauch-exponierten Mäusen oder in COPD-Patienten wurde bis jetzt noch nicht erforscht. Die gefundene Serotonin-induzierte Apoptose in Alveolarepithelzellen unterstützt die schon in Abschnitt 5.3.3 beschriebenen Hypothesen zum Wirkmechanismus von Serotonin auf die Emphysementwicklung. Der reduzierende Effekt von Tergurid auf die Serotonin-induzierte Alveolarepithelzell-Apoptose könnte somit die emphysematöse Veränderungen in COPD-Patienten verhindern, wenn die Mausdaten auf den Menschen übertragbar sind.

In Anbetracht des Proliferations-Verhaltens von murinen Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II und Endothelzellen unter Zugabe von Serotonin und/oder Tergurid (Abbildung 4.20) konnte gezeigt werden, dass Serotonin die Proliferation in murinen Endothelzellen (ECs) Zellen induziert (Abbildung 4.20b), nicht aber in murinen Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II (Abbildung 4.20a). Eine Applikation von 10 µM Tergurid in Kombination mit 1 µM Serotonin verglichen mit den Serotonin behandelten EC-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation (Abbildung 4.20b). Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass Serotonin zu einer vaskulären Proliferation in PH führen kann [277]. Ein besonderes Merkmal des pulmonalvaskulären *Remodelings* ist, dass es nicht nur in der Gefäß-Media stattfindet, sondern alle Schichten der Gefäßwand umfasst und viele vaskuläre Zelltypen in diesen Prozess involviert sind [288]. Neben einer Proliferation der glatten Muskelzellen ist vor allem die Proliferation von Endothelzellen hervorzuheben [289, 290].

Die durch Serotonin ausgelöste Proliferation in Rauch-exponierten Mäusen oder in COPD-Patienten wurde bisher noch nicht erforscht. Die gefundene Serotonin-induzierte Proliferation in murinen Endothelzellen ist ein weiteres Indiz für die schon in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Hypothesen zum Wirkmechanismus von Serotonin auf das pulmonal-vaskuläre *Remodeling*. Der reduzierende Effekt von Tergurid auf die Serotonin-induzierte Endothelzell-Proliferation könnte somit eine pulmonale Hypertonie in COPD-Patienten verhindern, insofern die Mausdaten auf den Menschen übertragbar sind.

5.5 Mögliche Effekte von Tergurid als Dopamin-Agonist und Adrenozeptor-Antagonist in COPD

Wie schon im Abschnitt 2.4 erwähnt, hat Tergurid eine hohe Bindungsaffinität an dopaminerge, serotonerge und α -adrenerge Rezeptoren [200-202]. Viele Studien deuteten darauf hin, dass Zigarettenrauch zu einer Dysregulation des serotonergen Systems führt und somit eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COPD übernehmen kann (siehe Kapitel 2.3 und 2.3.1) [182, 186, 187, 192, 196, 240]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B} als auch der Serotonintransporter (5-HTT) an der Entwicklung einer PH und einer pulmonalen Fibrose beteiligt sind und somit auch in die Pathogenese der COPD mit assoziierter PH verwickelt sein könnten [119, 170, 191, 197, 205]. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Rolle von Tergurid auf remodeling Prozesse bei der Entwicklung von COPD mit Fokus auf strukturelle und funktionelle Veränderungen an kleinen Gefäßen und der Alveolen untersucht werden (*disease modifying therapeutical approach*), so dass sich auf die Wirkung von Tergurid als nicht-kompetitiver Serotonin-Rezeptor-Antagonist beschränkt wurde. Dennoch darf die partial agonistische Wirkung von Tergurid auf den Dopamin D₂-Rezeptoren und die potente antagonistische Wirkung von Tergurid auf die α_2 -Adrenozeptorsubtypen [204] nicht außer Acht gelassen werden.

In Abschnitt 2.4 wurde bereits erwähnt, dass Tergurid (Teluron ®) in Japan zur Behandlung von Hyperprolaktinämie und von Hypophysenadenomen zugelassen ist [205, 208, 209]. Hierbei wird die partial agonistische Wirkung von Tergurid auf Dopamin D₂-Rezeptoren in der Hypophyse ausgenutzt, was zu einer gesteigerten Ausschüttung von Dopamin führt und folglich die Freisetzung von Prolaktin in der Hypophyse hemmt [204]. Im zentralen Nervensystem steuert eine Aktivierung der Dopamin D₂-Rezeptoren die Euphorie, die Empfindung von Lust oder Freude [210]. In Bezug auf das zentrale Nervensystem, bei denen eine Störung bei der Bildung des Neurotransmitter Dopamin vermutet wird, wurde die

Wirkung von Tergurid als partial Agonist an Dopamin D₂-Rezeptoren in neurologischen Erkrankungen (wie z.B. Parkinson, Fibromyalgie, Restless-Legs-Syndrom) getestet [209, 211-215]. Studien zur Rolle dopaminerger Effekte in COPD betreffen den bronchialen Bereich der Lunge und beschränken sich auf die Effekte von Dopamin-Rezeptor-Agonisten auf die sensorische Nervenaktivität [291-293]. Sensorische Nerven in den Atemwegen regulieren zentrale und lokale Reflexe. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inflammation der Atemwege die Aktivität der sensorischen Nerven erhöht resultierend in einer Verstärkung der zentralen und lokalen Reflexe, so dass über die Stimulation der afferenten zentralen Reflexe eine erhöhte Bronchokonstriktion, Schleimsekretion und Husten hervorgerufen wurde [294]. Dopamin-D₂-Rezeptor-Agonisten konnten eine Depolarisation des *Nervus vagus* in Ratten und Menschen hemmen [291, 292, 295, 296]. Neuere Studien konnten eine mRNA- und Protein-Expression der Dopamin-D₂-Rezeptoren in den glatten Muskelzellen der Atemwege in Meerschweinchen und Menschen nachweisen. Eine Applikation von Dopamin führte zu einer Dilatation der Bronchien [293]. In Bezug auf COPD werden Dopamin-Agonisten zur Behandlung der Symptome (Atemlosigkeit, Husten und erhöhte Schleimproduktion) vorgeschlagen (*symptomatic treatment*) [291, 292].

Tergurid wird zusätzlich als ein potenter Antagonist der α_2 -adrenergen Monoaminrezeptoren beschrieben [204]. Die physiologischen Agonisten der α_2 -Adrenozeptoren sind die Catecholamine Noradrenalin (Neurotransmitter) und Adrenalin (Hormon und Neurotransmitter) [210]. Eine Stimulation von α_2 -Adrenozeptoren aktiviert G_{i/o}-Proteine, wodurch die Adenylylcyclase inhibiert wird resultierend in einer Hemmung der cAMP-Bildung [297, 298]. Der genaue Effekt von α_2 -adrenergen Rezeptor-Antagonisten in COPD wurde bisher nicht erforscht. Dennoch gibt es viele Studien die eine Rolle von cAMP in COPD beschreiben [299, 300] [100-103]. Durch eine erhöhte cAMP-Produktion konnte z.B. eine verminderte Inflammation und eine Dilatation der glatten Muskelzellen in den Atemwegen von COPD-Patienten beobachtet werden [299]. Derzeit werden Symptome der COPD-Patienten mit Substanzen (z.B. Salbutamol, Fenoterol, Salmeterol, Formoterol, Indacaterol) behandelt, die zu einer erhöhten cAMP-Produktion führen. Diese Substanzen relaxieren die Atemwegsmuskulatur durch eine Stimulierung der β_2 -adrenergen-Rezeptoren (β_2 -Agonisten). Es kommt zu einer erhöhten cAMP-Produktion und einer damit verbundenen Hemmung einer Konstriktion der Bronchien [100-103]. Spekulativ könnte gesagt werden, dass Tergurid eine Stimulation der α_2 -Adrenozeptoren verhindert, so dass es nicht zu einer Hemmung der Adenylylcyclase kommt und cAMP gebildet werden kann. Dies könnte eine Inflammation in COPD-Patienten verringern und eine Dilatation der glatten Muskulatur in

den Atemwegen hervorrufen. Bestätigt werden könnte diese Spekulation durch eine Studie über das Wirkspektrum von Tergurid, in der Tergurid eine α -Adrenozeptoragonist-induzierte Kontraktion an Schweinepulmonalvenen verhinderte [204].

5.6 Fazit

Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise darauf, dass eine Dysregulation der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} eine pathogenetische Rolle im Zuge des Rauch-induzierten Lungenemphysems und der COPD spielen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} in COPD-Patienten (GOLD-IV-Stadium) und in Rauch-exponierten Mäusen verstärkt exprimiert sind. Eine präventive Behandlung mit dem 5-HTR_{2A}- und 5-HTR_{2B}-Antagonist Tergurid schützte vor einer Entstehung eines Emphysems und einer pulmonalen Hypertonie sowie eines vaskulären *Remodelings* in Rauch-exponierten Mäusen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vor allem der Rezeptor 5-HTR_{2A} verstärkt in pulmonalen Gefäßen Rauch-exponierter Mäuse exprimiert wird und somit eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der pulmonalen Vasokonstriktion haben könnte. Weiterhin ist dieser Rezeptor anscheinend ein wichtiger molekularer Faktor für die Entstehung einer Rauch-induzierten pulmonalen Hypertonie. Im Gegensatz hierzu konnte eine erhöhte Expression des Rezeptors 5-HTR_{2B} in den pulmonalen Alveolar-Septen Rauch-exponierter Mäuse nachgewiesen werden, welche möglicherweise mit der Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems assoziiert ist. Die präventive Behandlung mit Tergurid konnte die erhöhte Expression beider Rezeptoren normalisieren. Des Weiteren führte die präventive Behandlung mit Tergurid zu einem niedrigeren Serotonin-Spiegel im Plasma, nicht aber zu einer reduzierten Nitrotyrosin-Bildung in Rauch-exponierten Mäusen. Die Daten zum Einfluss von Serotonin und/oder Tergurid auf zelluläre Prozesse, wie das Apoptose- und Proliferations-Verhalten, bestätigen den anti-apoptotischen und anti-proliferatorischen Effekt von Tergurid, so dass Tergurid durchaus als eine neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung einer COPD in Frage kommen könnte. Zusätzlich sollte die Wirkung von Tergurid als Dopamin D₂-Rezeptoragonist nicht vergessen werden. Die daraus resultierende antidepressive Wirkung könnte bei Patienten mit COPD ebenfalls eine gewisse Rolle bei der Verbesserung des Allgemeinbefindens spielen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Dopamin-Rezeptor-Agonisten Symptome wie Husten und Schleimabsonderungen hemmen, welche zu den AHA-Symptomen von COPD-Patienten gehören.

5.7 Ausblick

Derzeit ist COPD nicht heilbar. Es können nur einzelne Symptome der COPD gelindert werden. Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen zur Beteiligung der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} in der Pathogenese der COPD und der schützenden Wirkung von Tergurid auf das Rauch-induzierte Lungenemphysem assoziiert mit einer PH konnte ein neuer wichtiger Signalweg identifiziert werden, der bei der Aufschlüsselung der Pathogenese der COPD von wesentlicher Bedeutung sein könnte. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass Tergurid in Mäusen vor der Entwicklung eines Rauch-induzierten Lungenemphysems und einer pulmonalen Hypertonie in Verbindung mit einem vaskulären Remodeling schützt. Vorausgesetzt, dass die Daten der mit Tergurid präventiv-behandelten Mäuse auf den COPD-Patienten übertragbar sind, würden diese Erkenntnisse eine große Bedeutung für das Aufhalten der COPD-Erkrankung bei einem Menschen haben. Um herauszufinden, ob Tergurid eine bereits ausgebildete COPD reversieren kann, sollten Studien zum kurativen Effekt von Tergurid auf Rauch-exponierte Mäuse durchgeführt werden. Im Fokus weiterer Experimente sollte die Identifikation der spezifischen, molekularen Signalwege stehen, die den Tergurid-Effekten zu Grunde liegen, wie z.B. der Effekt von Tergurid auf das dopaminerge und adrenerge System. Ebenso sollte die Bedeutung des serotonergen Systems in der Pathogenese der COPD weiter untersucht werden. Möglicherweise könnten so Interaktionen mit anderen wichtigen Genen herausgefunden werden, wie z.B. der iNOS. Auch eine Kreuzung von gewebsspezifischen, genetisch modifizierten Mäusen (z.B. ein Knockout der Serotoninrezeptoren oder des Transporters) könnte einen tieferen Einblick bezüglich der Rolle der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} bei der Entstehung oder der Reversibilität einer COPD liefern.

6 Zusammenfassung

Weltweit gehört die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zu den häufigsten Todesursachen mit steigender Inzidenz. Neben den erheblichen Leiden für den Patienten kommt es zu zunehmenden sozioökonomischen Belastungen. Bis heute ist noch kein Therapieansatz verfügbar, der die Progression der COPD-Erkrankung verhindert oder gar heilen kann. Derzeit können lediglich die Symptome gelindert und die Lebensqualität der COPD-Patienten verbessert werden. Die genauen Mechanismen, die zur Pathogenese der COPD führen, sind bisher nur ungenügend erforscht. Es gibt Hinweise darauf, dass Zigarettenrauch zu einer Dysregulation des serotonergen Systems führt und somit eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der COPD spielen könnte. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher die Bedeutung der Serotoninrezeptoren 5-HTR_{2A/2B} und des Serotonintransporters (5-HTT) in Lungen von COPD-Patienten, als auch in Rauch-exponierten Mäusen für die Pathogenese der COPD untersucht werden. Insbesondere stand die Analyse der therapeutischen präventiven Wirkung des nicht-kompetitiven Serotonin-Rezeptor-Antagonisten Tergurid auf die Entwicklung des Rauch-induzierten Emphysems und der pulmonalen Hypertonie an Mäusen im Vordergrund. Darüber hinaus sollten Ansatzpunkte erarbeitet werden, um den Mechanismus der Serotonin-Rezeptoren und des präventiven Effektes von Tergurid auf das Rauch-induzierte Lungenemphysem an Mäuse aufzudecken. Durch Real-time PCR und Western Blot Analysen konnte eine signifikant erhöhte Expression von 5-HTR_{2A} und 5-HTR_{2B} im Lungenhomogenat von COPD-Patienten, als auch in 8 Monaten Rauch-exponierten Mäusen nachgewiesen werden. Mit Hilfe des verwendeten Zigarettenrauch-induzierten Lungenemphysem-Mausmodells und einer präventiven Medikation von Tergurid konnte gezeigt werden, dass Tergurid einen protektiven Einfluss auf die Rauch-induzierten strukturellen und funktionellen Veränderungen des Lungengefäßsystems und der Alveolen hat. Eine präventive Behandlung mit Tergurid im Rauch-induzierten Emphysem führte zu einer deutlichen Verbesserung der Lungenfunktion und zu einer Verminderung des Emphysems in den Lungen der Mäuse. Im Hinblick auf die Rauch-induzierte pulmonale Hypertonie konnte bei den Tergurid-behandelten Rauch-exponierten Tieren ein deutlich niedrigerer systolischer rechtsventrikulärer Druck, eine reduzierte Muskularisierung der kleinen Gefäße und ein Ausbleiben einer Rechtsherzhypertrophie, als auch ein geringerer Verlust der pulmonalen Gefäße festgestellt werden. Des Weiteren führte Tergurid zu einem erhöhten Serotoninspiegel im Plasma Rauch-

exponierter Mäuse. Durch Kompartiment-spezifische Analysen wurde eine erhöhte Expression des 5-HTTs in Gefäßen von Placebo-behandelten Rauch-exponierten Mäusen detektiert. In den alveolaren Septen dieser Versuchsgruppe konnte weiterhin eine erhöhte Expression des 5-HTR_{2B} und des 5-HTTs ermittelt werden. Tergurid führte in den Gefäßen Rauch-exponierter Mäuse zu einer deutlich reduzierten Expression von 5-HTR_{2A} und 5-HTT. In den Alveolar-Septen hingegen zeigten Tergurid-behandelte Rauch-exponierter Mäuse eine verminderte 5-HTR_{2B} und 5-HTT-Expression. Eine Rauch-induzierte gesteigerte 3-Nitrotyrosin-Bildung konnte durch Tergurid nicht verhindert werden. Auf zellulärer Ebene zeigte Tergurid eine anti-apoptotische Wirkung auf die Serotonin-bedingte erhöhte Apoptose-Rate in murinen Alveolarepithelzellen Typ II (AEC II) als auch eine anti-proliferatorische Wirkung auf die durch Serotonin-induzierte erhöhte Proliferation in murinen Endothelzellen. Eine präventive Behandlung mit Tergurid scheint somit vor einer Rauch-induzierten pulmonalen Hypertonie und einem Lungenemphysem in Mäusen zu schützen. Vorausgesetzt, dass man diese Ergebnisse auf die Menschen übertragen kann, könnte Tergurid als eine neue Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit COPD in Frage kommen.

7 Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of death worldwide, with a rising incidence. Besides the burden for the patients it results also in a high socioeconomic burden. To date there is still no therapy available that can either cure or even prevent the progression of COPD. Currently, only symptoms can be alleviated to improve slightly the quality of life of COPD patients. The pathogenesis of COPD is still not fully understood.

There are indications that cigarette smoke leads to a dysregulation of the serotonergic system and thus could play an important role in the pathogenesis of COPD. Therefore the objectives of the present thesis were to investigate the influence of serotonin receptors 5-HTR_{2A/2B} and the serotonin transporter (5-HTT) in lungs of COPD patients as well as in smoke-exposed mice. Another focus was to analyse a putative preventive therapeutic effect of the non-competitive serotonin receptor inhibitor terguride on the development of smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. Additionally, this study aimed to discover potential mechanisms of serotonin receptors and the preventive terguride-effect on smoke-induced lung emphysema in mice.

Real-time PCR and western blot analysis showed an increased expression of 5-HTR_{2A} and 5-HTR_{2B} in lungs from COPD patients compared to healthy donors. Similar alterations were found in 8 months tobacco smoke-exposed mice. By using the tobacco smoke-induced emphysema mouse model and a parallel preventive application with terguride, it was shown that terguride had a protective effect on the smoke-induced structural and functional changes of the pulmonary vasculature and alveoli. Terguride treatment led to a significant improvement of lung function and a reduction of emphysema in mice. With regard to smoke-induced pulmonary hypertension a significantly lower right ventricular systolic pressure, reduced muscularization of small vessels and an absence of a right heart hypertrophy as well as a smaller loss of pulmonary vessels were found in terguride treated smoke-exposed animals. Furthermore terguride led to increased serotonin levels in blood plasma of smoke-exposed mice. A compartment-specific analysis determined an increased expression of 5-HTT in vessels and an increased expression of 5-HTR_{2B} and the 5-HTT in the pulmonary alveolar septa of placebo-treated smoke-exposed mice. In vessels of terguride treated smoke-exposed mice a significantly reduced expression of 5-HTR_{2A} and 5-HTT could be detected. However, terguride-treated smoke-exposed mice showed a decreased 5-HTR_{2B} and 5-HTT expression in alveolar septa.

The previously described smoke-induced 3-nitrotyrosine formation could not be prevented by terguride. On cellular level terguride showed an anti-apoptotic effect on the serotonin-induced increase of apoptosis in alveolar epithelial cells type II (AEC II) as well as an anti-proliferative effect on the serotonin-induced increase of proliferation in endothelial cells.

Taken together, tobacco smoke inhalation seems to affect the expression of 5-HTR_{2A/2B} and treatment of mice with the 5-HTR_{2A/2B} inhibitor terguride can prevent smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. If these data are transferable to humans, pharmacologic approaches that target the receptors 5-HTR_{2A/2B} may offer new treatment options for patients with COPD.

8 Literaturverzeichnis

1. Penzlin, *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Vol. 6. Auflage. 1996, Jena: Gustav Fischer Verlag.
2. Clauss Wolfgang, C.C., *Tierphysiologie kompakt*. Vol. 1. 2007, München: Elsevier GmbH, Spektrum Akademische Verlag.
3. Mörike KD, B.E.u.M.W., *Ein Lehrbuch der Anatomie, Physiologie und Entwicklungsgeschichte des Menschen*. Vol. 9. Auflage. 1976, Heidelberg: Quelle und Meyer.
4. Eckert, R., *Tierphysiologie*. Vol. 4. Auflage. 2002, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
5. Campbell, *Biologie*. Vol. 6. Auflage. 2003, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
6. Silbernagl S, D.A., *Taschenatlas der Physiologie*. Vol. 7. Auflage. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag
7. http://www.krebshilfe.net/beratung/_lungenkrebs.shtm.
8. <http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/alveole/>.
9. Golenhofen, *Physiologie heute*. Vol. 2. Auflage. 2000, München: Urban & Fischer Verlag.
10. http://www.uni-graz.at/spow2wwwwww_vo_physiologie_2_im_ss2008_lunge_und_atmung.pdf.
Physiologie 2. 2008.
11. <http://patientenleitlinien.de/Herzinsuffizienz/herzinsuffizienz.html>.
12. <http://www.wissen.de/medizin/ader>.
13. Matthay, M.A., L. Robriquet, and X. Fang, *Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(3): p. 206-13.
14. Roche, *Lexikon Medizin*. Vol. 5. Aufl. 2003: Urban und Fischer.
15. www.goldcopd.org. 2013.
16. Barnes, P.J., *Chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 269-80.
17. Barnes, P.J., *Mediators of chronic obstructive pulmonary disease*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(4): p. 515-48.

18. Vestbo, J., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med. **187**(4): p. 347-65.
19. www.goldcopd.org, *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD*. 2013.
20. Barnes, P.J., S.D. Shapiro, and R.A. Pauwels, *Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms*. Eur Respir J, 2003. **22**(4): p. 672-88.
21. www.copd-aktuell.de. *AHA-Die Symptome der COPD*. 2013.
22. Lopez, A.D., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections*. Eur Respir J, 2006. **27**(2): p. 397-412.
23. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
24. Salvi, S.S. and P.J. Barnes, *Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers*. Lancet, 2009. **374**(9691): p. 733-43.
25. Schirnhofner, L., et al., *COPD prevalence in Salzburg, Austria: results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study*. Chest, 2007. **131**(1): p. 29-36.
26. Halbert, R.J., et al., *Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis*. Eur Respir J, 2006. **28**(3): p. 523-32.
27. Fukuchi, Y., et al., *COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study*. Respiriology, 2004. **9**(4): p. 458-65.
28. Buist, A.S., W.M. Vollmer, and M.A. McBurnie, *Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The burden of obstructive lung disease (BOLD) initiative*. Int J Tuberc Lung Dis, 2008. **12**(7): p. 703-8.
29. Pauwels, R.A., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(5): p. 1256-76.
30. Mannino, D.M. and A.S. Buist, *Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends*. Lancet, 2007. **370**(9589): p. 765-73.
31. Halken, S., et al., *Passive smoking as a risk factor for development of obstructive respiratory disease and allergic sensitization*. Allergy, 1995. **50**(2): p. 97-105.
32. Dayal, H.H., et al., *Passive smoking in obstructive respiratory disease in an industrialized urban population*. Environ Res, 1994. **65**(2): p. 161-71.

33. Chen, R., *Passive smoking exposure and risk of COPD in China*. Lancet, 2008. **371**(9608): p. 201; author reply 201-2.
34. Tudor, R.M. and I. Petrache, *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2749-55.
35. Barnes, P.J. and M.G. Cosio, *Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease*. PLoS Med, 2004. **1**(1): p. e20.
36. Hnizdo, E., et al., *Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Epidemiol, 2002. **156**(8): p. 738-46.
37. Balmes, J., et al., *American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(5): p. 787-97.
38. Lopez, A.D., et al., *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data*. Lancet, 2006. **367**(9524): p. 1747-57.
39. Abbey, D.E., et al., *Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(1): p. 289-98.
40. Kohnlein, T. and T. Welte, *Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment*. Am J Med, 2008. **121**(1): p. 3-9.
41. Poller, W., et al., *Mis-sense mutation of alpha 1-antichymotrypsin gene associated with chronic lung disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1538.
42. Joos, L., et al., *The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(5): p. 569-76.
43. Hunninghake, G.M., et al., *MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations*. N Engl J Med, 2009. **361**(27): p. 2599-608.
44. Lomas, D.A. and E.K. Silverman, *The genetics of chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Res, 2001. **2**(1): p. 20-6.
45. Mannino, D.M. and K.J. Davis, *Lung function decline and outcomes in an elderly population*. Thorax, 2006. **61**(6): p. 472-7.
46. Seemungal, T., et al., *Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(9): p. 1618-23.
47. Sethi, S., et al., *Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(9): p. 991-8.

48. Barker, D.J., et al., *Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease*. BMJ, 1991. **303**(6804): p. 671-5.
49. Silva, G.E., et al., *Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study*. Chest, 2004. **126**(1): p. 59-65.
50. de Marco, R., et al., *Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(7): p. 891-7.
51. de Marco, R., et al., *Incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a cohort of young adults according to the presence of chronic cough and phlegm*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(1): p. 32-9.
52. C.Vogelmeier, R.K., H. Fehrenbach, R. Bals, *Pathogenese der COPD*. Der Internist 2006, 2006. **9**: p. 885-894.
53. Hogg, J.C., *Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 709-21.
54. Currie, G.P., *ABC of COPD*. 2007, Malden, Mass.: BMJ Books, Blackwell Pub. p.
55. Churg, A., M. Cosio, and J.L. Wright, *Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(4): p. L612-31.
56. Agusti, A.G., et al., *Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 2003. **21**(2): p. 347-60.
57. Barnes, P.J., *Small airways in COPD*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2635-7.
58. Hogg, J.C. and R.M. Senior, *Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema*. Thorax, 2002. **57**(9): p. 830-4.
59. Wright, J.L., M. Cosio, and A. Churg, *Animal models of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(1): p. L1-15.
60. Barbera, J.A., V.I. Peinado, and S. Santos, *Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 2003. **21**(5): p. 892-905.
61. Rabinovitch, M., *Pathobiology of pulmonary hypertension*. Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 369-99.
62. Russell, R.E., et al., *Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(4): p. L867-73.

-
63. Lim, S., et al., *Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1355-60.
 64. Vandivier, R.W., et al., *Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis*. J Clin Invest, 2002. **109**(5): p. 661-70.
 65. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York: Garland Science. 1 v. (various pagings).
 66. Meshi, B., et al., *Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(1): p. 52-7.
 67. Lacoste, J.Y., et al., *Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **92**(4): p. 537-48.
 68. Finkelstein, R., et al., *Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(5 Pt 1): p. 1666-72.
 69. MacNee, W., et al., *The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs*. N Engl J Med, 1989. **321**(14): p. 924-8.
 70. Sparrow, D., et al., *The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men*. Chest, 1984. **86**(3): p. 383-6.
 71. Di Stefano, A., et al., *Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(4): p. 1277-85.
 72. Saetta, M., et al., *CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 711-7.
 73. Groneberg, D.A. and K.F. Chung, *Models of chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Res, 2004. **5**: p. 18.
 74. Shapiro, S.D., *Proteolysis in the lung*. Eur Respir J Suppl, 2003. **44**: p. 30s-32s.
 75. Nadel, J.A., *Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies*. Chest, 2000. **117**(5 Suppl 2): p. 386S-9S.
 76. Finlay, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(1): p. 240-7.
 77. Hautamaki, R.D., et al., *Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice*. Science, 1997. **277**(5334): p. 2002-4.

78. Ohnishi, K., et al., *Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema*. Lab Invest, 1998. **78**(9): p. 1077-87.
79. Cawston, T., et al., *Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease*. Novartis Found Symp, 2001. **234**: p. 205-18; discussion 218-28.
80. Shapiro, S.D. and E.P. Ingenito, *The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(5): p. 367-72.
81. Repine, J.E., A. Bast, and I. Lankhorst, *Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease*. Oxidative Stress Study Group. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 341-57.
82. MacNee, W., *Oxidative stress and lung inflammation in airways disease*. Eur J Pharmacol, 2001. **429**(1-3): p. 195-207.
83. Taggart, C., et al., *Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27258-65.
84. Janssen, L.J., *Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(6): p. L1067-82.
85. MacNee, W., *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(4): p. 258-66; discussion 290-1.
86. Barnes, P.J. and M. Karin, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. N Engl J Med, 1997. **336**(15): p. 1066-71.
87. Barnes, P.J., *Defective antioxidant gene regulation in COPD: a case for broccoli*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(6): p. 552-4.
88. Fehrenbach, H., et al., *Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis*. Eur Respir J, 1999. **14**(3): p. 534-44.
89. Yokohori, N., K. Aoshiba, and A. Nagai, *Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema*. Chest, 2004. **125**(2): p. 626-32.
90. Kasahara, Y., et al., *Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(3 Pt 1): p. 737-44.

91. Demedts, I.K., et al., *Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema*. Respir Res, 2006. **7**: p. 53.
92. Tudor, R.M., et al., *Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(1): p. 88-97.
93. Tudor, R.M., Y. Kasahara, and N.F. Voelkel, *Inhibition of vascular endothelial growth factor receptors causes emphysema in rats*. Chest, 2000. **117**(5 Suppl 1): p. 281S.
94. Taraseviciene-Stewart, L., et al., *Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease?* Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(8): p. 687-90.
95. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
96. Powell, W.C., et al., *The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis*. Curr Biol, 1999. **9**(24): p. 1441-7.
97. Barnes, P.J., *Emerging targets for COPD therapy*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(6): p. 675-83.
98. Tashkin, D., et al., *Smoking cessation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, placebo-controlled, randomised trial*. Lancet, 2001. **357**(9268): p. 1571-5.
99. Tashkin, D.P., et al., *Effects of varenicline on smoking cessation in patients with mild to moderate COPD: a randomized controlled trial*. Chest, 2011. **139**(3): p. 591-9.
100. Chapman, K.R., et al., *Long-term safety and efficacy of indacaterol, a long-acting beta(2)-agonist, in subjects with COPD: a randomized, placebo-controlled study*. Chest, 2011. **140**(1): p. 68-75.
101. Donohue, J.F., et al., *Once-daily bronchodilators for chronic obstructive pulmonary disease: indacaterol versus tiotropium*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(2): p. 155-62.
102. Grove, A., et al., *Effects of regular salmeterol on lung function and exercise capacity in patients with chronic obstructive airways disease*. Thorax, 1996. **51**(7): p. 689-93.
103. Tashkin, D.P. and L.M. Fabbri, *Long-acting beta-agonists in the management of chronic obstructive pulmonary disease: current and future agents*. Respir Res, 2010. **11**: p. 149.

104. Barr, R.G., et al., *Inhaled tiotropium for stable chronic obstructive pulmonary disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(2): p. CD002876.
105. Disse, B., et al., *Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease*. Life Sci, 1999. **64**(6-7): p. 457-64.
106. Spencer, S., et al., *Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD*. Eur Respir J, 2004. **23**(5): p. 698-702.
107. Fiore, A.E., et al., *Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009*. MMWR Recomm Rep, 2009. **58**(RR-8): p. 1-52.
108. Schaberg, *Pneumokokkenschutzimpfung*. Pneumologie, 2001. **55**: p. 543-545.
109. Lacasse, Y., et al., *Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2002(3): p. CD003793.
110. Steiner, M.C., et al., *Nutritional enhancement of exercise performance in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial*. Thorax, 2003. **58**(9): p. 745-51.
111. McEvoy, R.D., et al., *Nocturnal non-invasive nasal ventilation in stable hypercapnic COPD: a randomised controlled trial*. Thorax, 2009. **64**(7): p. 561-6.
112. *Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. Report of the Medical Research Council Working Party*, in *Lancet*. 1981. p. 681-6.
113. Cooper, J.D., et al., *Results of 150 consecutive bilateral lung volume reduction procedures in patients with severe emphysema*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996. **112**(5): p. 1319-29; discussion 1329-30.
114. Criner, G., et al., *Effect of lung volume reduction surgery on diaphragm strength*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(5 Pt 1): p. 1578-85.
115. www.lungenaerzte-im-netz.de. *Endoskopische Lungenvolumenreduktion gegen Lungenüberblähung*. 2012.
116. Hosenpud, J.D., et al., *Effect of diagnosis on survival benefit of lung transplantation for end-stage lung disease*. Lancet, 1998. **351**(9095): p. 24-7.
117. Theodore, J. and N. Lewiston, *Lung transplantation comes of age*. N Engl J Med, 1990. **322**(11): p. 772-4.
118. www.uni-freiburg.de. *Emphysemchirurgie*. 2012.
119. Hoyer, D., J.P. Hannon, and G.R. Martin, *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **71**(4): p. 533-54.

120. Woolley, D.W., *The biochemical bases of psychoses; or, The serotonin hypothesis about mental diseases*. 1962, New York,: Wiley. 331 p.
121. Woolley, D.W. and T. van der Hoeven, *Alteration in Learning Ability Caused by Changes in Cerebral Serotonin and Catechol Amines*. Science, 1963. **139**(3555): p. 610-1.
122. Filip, M. and M. Bader, *Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(5): p. 761-77.
123. Walther, D.J. and M. Bader, *A unique central tryptophan hydroxylase isoform*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(9): p. 1673-80.
124. Walther, D.J., et al., *Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform*. Science, 2003. **299**(5603): p. 76.
125. Alenina, N., et al., *Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(25): p. 10332-7.
126. Nakamura, K. and H. Hasegawa, *Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system*. Mol Neurobiol, 2007. **35**(1): p. 45-54.
127.
<http://homepage.psy.utexas.edu/homepage/class/Psy332/Salinas/Neurotransmitters/Slide10.GIF>.
128. Filip, M., et al., *The serotonergic system and its role in cocaine addiction*. Pharmacol Rep, 2005. **57**(6): p. 685-700.
129. Green, A.R., *Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S145-52.
130. Gershon, M.D. and J. Tack, *The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 397-414.
131. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:5-HT_Neuron.svg, J.S. 5-HT-Neuron. 2010.
132. Hilaire, G., et al., *The role of serotonin in respiratory function and dysfunction*. Respir Physiol Neurobiol, 2010. **174**(1-2): p. 76-88.
133. Pytliak, M., et al., *Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications*. Physiol Res, 2010. **60**(1): p. 15-25.
134. Berger, M., J.A. Gray, and B.L. Roth, *The expanded biology of serotonin*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 355-66.
135. Hoyer, D., et al., *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 157-203.

-
136. Nelson, R.J. and B.C. Trainor, *Neural mechanisms of aggression*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 536-46.
137. Wurtman, R.J. and J.J. Wurtman, *Brain Serotonin, Carbohydrate-craving, obesity and depression*. Adv Exp Med Biol, 1996. **398**: p. 35-41.
138. Paterson, D.S., et al., *Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome*. JAMA, 2006. **296**(17): p. 2124-32.
139. Saxena, P.R. and A. Lawang, *A comparison of cardiovascular and smooth muscle effects of 5-hydroxytryptamine and 5-carboxamidotryptamine, a selective agonist of 5-HT₁ receptors*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1985. **277**(2): p. 235-52.
140. de Jong, T.R., et al., *Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold*. Neurosci Biobehav Rev, 2006. **30**(7): p. 893-907.
141. Nichols, D.E., *Hallucinogens*. Pharmacol Ther, 2004. **101**(2): p. 131-81.
142. Doggrell, S.A., *The role of 5-HT on the cardiovascular and renal systems and the clinical potential of 5-HT modulation*. Expert Opin Investig Drugs, 2003. **12**(5): p. 805-23.
143. Lesurtel, M., et al., *Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration*. Science, 2006. **312**(5770): p. 104-7.
144. Nebigil, C.G. and L. Maroteaux, *Functional consequence of serotonin/5-HT_{2B} receptor signaling in heart: role of mitochondria in transition between hypertrophy and heart failure?* Circulation, 2003. **108**(7): p. 902-8.
145. Nebigil, C.G., et al., *Overexpression of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy*. Circulation, 2003. **107**(25): p. 3223-9.
146. Launay, J.M., et al., *Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1129-35.
147. Costedio, M.M., N. Hyman, and G.M. Mawe, *Serotonin and its role in colonic function and in gastrointestinal disorders*. Dis Colon Rectum, 2007. **50**(3): p. 376-88.
148. Gershon, M.D., *Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20 Suppl 7**: p. 3-14.
149. Minami, M., et al., *Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity*. Pharmacol Ther, 2003. **99**(2): p. 149-65.

150. Ramage, A.G. and C.M. Villalon, *5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(9): p. 472-81.
151. Birkeland, J.A., et al., *Effects of treatment with a 5-HT₄ receptor antagonist in heart failure*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(2): p. 143-52.
152. Thomas, D.R., *5-HT_{5A} receptors as a therapeutic target*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(3): p. 707-14.
153. Johnson, C.N., M. Ahmed, and N.D. Miller, *5-HT₆ receptor antagonists: prospects for the treatment of cognitive disorders including dementia*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2008. **11**(5): p. 642-54.
154. Hedlund, P.B. and J.G. Sutcliffe, *Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(9): p. 481-6.
155. Eddahibi, S., et al., *Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin*. Circ Res, 1999. **84**(3): p. 329-36.
156. Lee, S.L., et al., *Dual effect of serotonin on growth of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture*. Circ Res, 1991. **68**(5): p. 1362-8.
157. Quick, M.W., *Regulating the conducting states of a mammalian serotonin transporter*. Neuron, 2003. **40**(3): p. 537-49.
158. Keyes, S.R. and G. Rudnick, *Coupling of transmembrane proton gradients to platelet serotonin transport*. J Biol Chem, 1982. **257**(3): p. 1172-6.
159. Marcos, E., et al., *Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(4): p. 487-93.
160. Keegan, A., et al., *Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1231-9.
161. Pakala, R., J.T. Willerson, and C.R. Benedict, *Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 1919-26.
162. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
163. Kekewska, A., et al., *Antiserotonergic properties of terguride in blood vessels, platelets, and valvular interstitial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **340**(2): p. 369-76.

164. Wei, L., et al., *JNK regulates serotonin-mediated proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **298**(6): p. L863-9.
165. Eddahibi, S., et al., *Is the serotonin transporter involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension?* J Lab Clin Med, 2002. **139**(4): p. 194-201.
166. Eddahibi, S. and S. Adnot, *Anorexigen-induced pulmonary hypertension and the serotonin (5-HT) hypothesis: lessons for the future in pathogenesis*. Respir Res, 2002. **3**: p. 9.
167. Sparrow, D., et al., *Relationship of urinary serotonin excretion to cigarette smoking and respiratory symptoms. The Normative Aging Study*. Chest, 1992. **101**(4): p. 976-80.
168. Racke, K., H. Schworer, and G. Simson, *Effects of cigarette smoking or ingestion of nicotine on platelet 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels in smokers and non-smokers*. Clin Investig, 1992. **70**(3-4): p. 201-4.
169. Marasini, B., et al., *Cigarette smoking and platelet function*. Thromb Res, 1986. **44**(1): p. 85-94.
170. Markovitz, J.H., L. Tolbert, and S.E. Winders, *Increased serotonin receptor density and platelet GPIIb/IIIa activation among smokers*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(3): p. 762-6.
171. Role, L.W. and D.K. Berg, *Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses*. Neuron, 1996. **16**(6): p. 1077-85.
172. Clarke, P.B., *Nicotinic receptors in mammalian brain: localization and relation to cholinergic innervation*. Prog Brain Res, 1993. **98**: p. 77-83.
173. Wonnacott, S., *Presynaptic nicotinic ACh receptors*. Trends Neurosci, 1997. **20**(2): p. 92-8.
174. Le Houezec, J., *Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review*. Int J Tuberc Lung Dis, 2003. **7**(9): p. 811-9.
175. Fowler, J.S., et al., *Comparison of monoamine oxidase a in peripheral organs in nonsmokers and smokers*. J Nucl Med, 2005. **46**(9): p. 1414-20.
176. Toninello, A., et al., *Amine oxidases in apoptosis and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1765**(1): p. 1-13.
177. Rendu, F., et al., *Smoking related diseases: the central role of monoamine oxidase*. Int J Environ Res Public Health, 2011. **8**(1): p. 136-47.

178. Rubenstein, D., J. Jesty, and D. Bluestein, *Differences between mainstream and sidestream cigarette smoke extracts and nicotine in the activation of platelets under static and flow conditions*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 78-83.
179. Herve, P., et al., *Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: role of serotonin*. Am J Med, 1990. **89**(1): p. 117-20.
180. Crowley, S.T., et al., *Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factors serotonin and adenosine diphosphate*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 1908-18.
181. Ito, T., et al., *Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2000. **102**(20): p. 2522-7.
182. Launay, J.M., et al., *Smoking induces long-lasting effects through a monoamine-oxidase epigenetic regulation*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7959.
183. Brenner, B., et al., *Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter*. J Neurochem, 2007. **102**(1): p. 206-15.
184. Rausch, J.L., et al., *Effect of nicotine on human blood platelet serotonin uptake and efflux*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1989. **13**(6): p. 907-16.
185. Mercado, C.P. and F. Kilic, *Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels*. Mol Interv. **10**(4): p. 231-41.
186. Lau, W.K., et al., *The role of circulating serotonin in the development of chronic obstructive pulmonary disease*. PLoS One, 2010. **7**(2): p. e31617.
187. Ulrich, S., et al., *Genetic polymorphisms of the serotonin transporter, but not the 2a receptor or nitric oxide synthetase, are associated with pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease*. Respiration, 2009. **79**(4): p. 288-95.
188. Eddahibi, S., et al., *Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1555-62.
189. Eddahibi, S., et al., *Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension*. J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1141-50.
190. Eddahibi, S., et al., *Hyperplasia of pulmonary artery smooth muscle cells is causally related to overexpression of the serotonin transporter in primary pulmonary hypertension*. Chest, 2002. **121**(3 Suppl): p. 97S-98S.
191. Eddahibi, S., et al., *Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease*. Circulation, 2003. **108**(15): p. 1839-44.

192. Lerman, C., et al., *The role of the serotonin transporter gene in cigarette smoking*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998. **7**(3): p. 253-5.
193. Morrell, N.W., et al., *Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S20-31.
194. Liolitsa, D., et al., *Association study of the 5-HT(2A) receptor gene polymorphism, T102C and essential hypertension*. J Hum Hypertens, 2001. **15**(5): p. 335-9.
195. Yamada, S., et al., *T102C polymorphism of the serotonin (5-HT) 2A receptor gene in patients with non-fatal acute myocardial infarction*. Atherosclerosis, 2000. **150**(1): p. 143-8.
196. Cao, L., et al., *Secondhand smoke exposure causes bronchial hyperreactivity via transcriptionally upregulated endothelin and 5-hydroxytryptamine 2A receptors*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e44170.
197. Dumitrascu, R., et al., *Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Eur Respir J, 2010. **37**(5): p. 1104-18.
198. Hart, C.M. and E.R. Block, *Lung serotonin metabolism*. Clin Chest Med, 1989. **10**(1): p. 59-70.
199. Herraiz, T. and C. Chaparro, *Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(2): p. 378-86.
200. Newman-Tancredi, A., et al., *Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. III. Agonist and antagonist properties at serotonin, 5-HT(1) and 5-HT(2), receptor subtypes*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(2): p. 815-22.
201. Newman-Tancredi, A., et al., *Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. II. Agonist and antagonist properties at subtypes of dopamine D(2)-like receptor and alpha(1)/alpha(2)-adrenoceptor*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(2): p. 805-14.
202. Millan, M.J., et al., *Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(2): p. 791-804.
203. <http://www.chemicalbook.com/CAS%5CGIF%5C37686-84-3.gif>.

-
204. Görnemann, T., *Derivate von Pergolid, Lisurid und Tergurid als Liganden serotonerger, adrenerger und dopaminerger Rezeptoren*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2008, Freien Universität Berlin: Berlin.
205. Königshoff, M., et al., *Increased expression of 5-hydroxytryptamine_{2A/B} receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention*. *Thorax*, 2010. **65**(11): p. 949-55.
206. Venturini, P.L., et al., *Suppression of puerperal lactation by terguride. A double-blind study*. *Gynecol Obstet Invest*, 1988. **26**(1): p. 33-8.
207. Venturini, P.L., et al., *Effect of terguride on prolactin levels in normal, puerperal and hyperprolactinaemic women*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1986. **30**(2): p. 195-7.
208. Ciccarelli, E. and F. Camanni, *Diagnosis and drug therapy of prolactinoma*. *Drugs*, 1996. **51**(6): p. 954-65.
209. Distler, O., et al., *Evaluation of the efficacy and safety of terguride in patients with fibromyalgia syndrome: results of a twelve-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study*. *Arthritis Rheum*, 2009. **62**(1): p. 291-300.
210. Aktories, F., Hofmann, Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. 2005, Elsevier GmbH München: Urban und Fischer Verlag.
211. Brucke, T., et al., *The partial dopamine receptor agonist terguride in the MPTP-induced hemiparkinsonian monkey model*. *Eur J Pharmacol*, 1988. **148**(3): p. 445-8.
212. Brucke, T., et al., *Terguride: partial dopamine agonist in the treatment of Parkinson's disease*. *Adv Neurol*, 1987. **45**: p. 573-6.
213. Sonka, K., M. Pretl, and K. Kranda, *Management of restless legs syndrome by the partial D₂-agonist terguride*. *Sleep Med*, 2003. **4**(5): p. 455-7.
214. Ikoma, Y., et al., *[Effects of terguride, an ergot alkaloid derivative, on the central nervous system: biochemical and behavioral studies]*. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 1993. **102**(2): p. 113-29.
215. Yukihiro Ikoma, Y.N., Mayumi Tsuzaki, Chie Murayama, Helmut Wachtel, Motonori Yamaguchi, *General Pharmacological Studies on Terguride, An Ergot Alkaloid Derivative*. Translation of JPN Pharmacol Ther, 1993. **21**: p. 733-749.
216. <http://www.theday.com/article/20100513/BIZ02/305139376/1044>. *Pfizer buys rights to German firm` hypertension drug*. 2010.
217. Kiselycznyk, C. and A. Holmes, *All (C57BL/6) Mice are not Created Equal*. *Front Neurosci*, 2011. **5**: p. 10.

-
218. <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>. *The Jackson Laboratory*. 2013
219. HSE, *Bedienungsanleitung zur Datenerfassungs Software für Atmungs-Experimente*. 2004.
220. Rosenkranz, S., et al., *[Right heart catheterization in pulmonary hypertension]*. Dtsch Med Wochenschr, 2011. **136**(50): p. 2601-16; quiz 2617-20.
221. Seimetz, M., et al., *Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice*. Cell, 2011. **147**(2): p. 293-305.
222. Mülhardt, C., *Der Experimentator "Molekularbiologie / Genomics"*. 2006, Elsevier GmbH: München.
223. W.Luttmann, K.B., M.Küpper, D.Myrtek, *Der Experimentator "Immunologie"*. Vol. 3. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
224. Foronjy, R.F., et al., *Structural emphysema does not correlate with lung compliance: lessons from the mouse smoking model*. Exp Lung Res, 2005. **31**(6): p. 547-62.
225. Churg, A., D.D. Sin, and J.L. Wright, *Everything prevents emphysema: are animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease any use?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(6): p. 1111-5.
226. Dr.h.c. Robert F Schmidt Ph.D, D.F.L., Dr. Manfred Heckmann, *Physiologie des Menschen "Atemregulation"*. Springer-Lehrbuch. 2011: Springer Berlin Heidelberg.
227. Oczenski, W., *Atmen - Atemhilfen: Atemphysiologie und Beatmungstechnik* Vol. 9. 2012: Thieme-Verlag.
228. Hogg, J.C., *Lung structure and function in COPD*. Int J Tuberc Lung Dis, 2008. **12**(5): p. 467-79.
229. Hogg, J.C., et al., *Lung structure and function in cigarette smokers*. Thorax, 1994. **49**(5): p. 473-8.
230. Brusselmans, K., et al., *Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia*. J Clin Invest, 2003. **111**(10): p. 1519-27.
231. Quaak, M., et al., *Genetic variation as a predictor of smoking cessation success. A promising preventive and intervention tool for chronic respiratory diseases?* Eur Respir J, 2009. **33**(3): p. 468-80.
232. Schwedhelm, E., *Isoprostane und 3-Nitrotyrosin als neue Indexparameter des oxidativen Stresses in vivo: Analytik, Bildung, Metabolismus und biologische Bedeutung*. 2000, Hannover.

233. Kharitonov, S.A. and P.J. Barnes, *Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Curr Allergy Asthma Rep, 2003. **3**(2): p. 121-9.
234. Abu-Qare, A.W. and M.B. Abou-Donia, *Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2001. **4**(3): p. 313-32.
235. Brindicci, C., et al., *Effects of aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on nitric oxide production and its metabolites in healthy control subjects, healthy smokers, and COPD patients*. Chest, 2009. **135**(2): p. 353-67.
236. Ichinose, M., et al., *Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(2 Pt 1): p. 701-6.
237. Yoshida, T. and R.M. Tudor, *Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(3): p. 1047-82.
238. Taraseviciene-Stewart, L. and N.F. Voelkel, *Molecular pathogenesis of emphysema*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 394-402.
239. Calabrese, F., et al., *Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema*. Respir Res, 2005. **6**: p. 14.
240. Lau, W.K., et al., *The involvement of serotonin metabolism in cigarette smoke-induced oxidative stress in rat lung in vivo*. Free Radic Res, 2012. **46**(11): p. 1413-9.
241. Wright, J.L. and A. Churg, *Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1422-8.
242. March, T.H., et al., *Modulators of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in A/J mice*. Toxicol Sci, 2006. **92**(2): p. 545-59.
243. Mahadeva, R. and S.D. Shapiro, *Animal models of pulmonary emphysema*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(6): p. 665-73.
244. Fehrenbach, H., *Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks*. Pathobiology, 2002. **70**(5): p. 277-83.
245. Liefländer, S.K., *Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Emphysementwicklung Surfactant Protein-D defizienter Mäuse in Medizinischen Fakultät*. 2008, Universität zu Lübeck.

246. Churg, A. and J.L. Wright, *Testing drugs in animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(6): p. 550-2.
247. Loric, S., et al., *Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation*. Mol Pharmacol, 1995. **47**(3): p. 458-66.
248. Bayer, H., et al., *Serotonergic receptors on human airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(1): p. 85-93.
249. Renzoni, E.A., et al., *Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts*. Respir Res, 2004. **5**: p. 24.
250. Kren, V., E. Eich, and H.H. Pertz, *Pergolide, terguride and N,N'-spacer-linked oligomers of both interact with 5-HT2A receptors of rat tail artery*. Physiol Res, 2004. **53**(1): p. 35-43.
251. Jahnichen, S., R. Horowski, and H.H. Pertz, *Agonism at 5-HT2B receptors is not a class effect of the ergolines*. Eur J Pharmacol, 2005. **513**(3): p. 225-8.
252. Kulisch, C., *THERAPEUTISCHER EFFEKT DES SEROTONIN-ANTAGONISTEN TERGURID IM MODELL DER MONOCROTALIN-INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE DER RATTE* 2011: Giessen.
253. Minai, O.A., A. Chaouat, and S. Adnot, *Pulmonary hypertension in COPD: epidemiology, significance, and management: pulmonary vascular disease: the global perspective*. Chest, 2010. **137**(6 Suppl): p. 39S-51S.
254. Voelkel, N.F. and C.D. Cool, *Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J Suppl, 2003. **46**: p. 28s-32s.
255. Wright, J.L., R.D. Levy, and A. Churg, *Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment*. Thorax, 2005. **60**(7): p. 605-9.
256. Peinado, V.I., S. Pizarro, and J.A. Barbera, *Pulmonary vascular involvement in COPD*. Chest, 2008. **134**(4): p. 808-14.
257. Woods, D.R., et al., *Endocrine aspects of high altitude acclimatization and acute mountain sickness*. J R Army Med Corps, 2011. **157**(1): p. 33-7.
258. Trubsbach, S.S., et al., *[Respiratory system at high altitude: pathophysiology and novel therapy options]*. Wien Klin Wochenschr, 2011. **123**(3-4): p. 67-77.
259. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(5): p. 588-94.

-
260. Miller, M.E., et al., *Diurnal levels of immunoreactive erythropoietin in normal subjects and subjects with chronic lung disease*. Br J Haematol, 1981. **49**(2): p. 189-200.
261. Weissmann, N., et al., *Congenital erythropoietin over-expression causes "anti-pulmonary hypertensive" structural and functional changes in mice, both in normoxia and hypoxia*. Thromb Haemost, 2005. **94**(3): p. 630-8.
262. Vogel, J. and M. Gassmann, *Erythropoietic and non-erythropoietic functions of erythropoietin in mouse models*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 6): p. 1259-64.
263. Wellman, T.L., et al., *Nitric oxide and reactive oxygen species exert opposing effects on the stability of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in explants of human pial arteries*. FASEB J, 2004. **18**(2): p. 379-81.
264. Bracke, K.R., et al., *Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4350-9.
265. Mitani, Y., et al., *Dexfenfluramine protects against pulmonary hypertension in rats*. J Appl Physiol, 2002. **93**(5): p. 1770-8.
266. Hoeper, M.M., et al., *Diagnosis, assessment, and treatment of non-pulmonary arterial hypertension pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S85-96.
267. Santos, S., et al., *Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD*. Eur Respir J, 2002. **19**(4): p. 632-8.
268. MacLean, M.R., et al., *Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circulation, 2004. **109**(17): p. 2150-5.
269. MacLean, M.R., et al., *5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(2): p. 161-8.
270. Morecroft, I., et al., *Functional interactions between 5-hydroxytryptamine receptors and the serotonin transporter in pulmonary arteries*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(2): p. 539-48.
271. Morecroft, I. and M.R. MacLean, *5-hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction and vasodilation in perinatal and adult rabbit small pulmonary arteries*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(1): p. 69-78.

-
272. Khalil, A.A., B. Davies, and N. Castagnoli, Jr., *Isolation and characterization of a monoamine oxidase B selective inhibitor from tobacco smoke*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(10): p. 3392-8.
273. Khalil, A.A., S. Steyn, and N. Castagnoli, Jr., *Isolation and characterization of a monoamine oxidase inhibitor from tobacco leaves*. Chem Res Toxicol, 2000. **13**(1): p. 31-5.
274. Lau, W.K., et al., *The role of circulating serotonin in the development of chronic obstructive pulmonary disease*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31617.
275. MacLean, M.R., et al., *5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(5): p. 917-30.
276. Forbes, I.T., et al., *N-(1-methyl-5-indolyl)-N'-(3-methyl-5-isothiazolyl)urea: a novel, high-affinity 5-HT_{2B} receptor antagonist*. J Med Chem, 1995. **38**(6): p. 855-7.
277. Eddahibi, S., et al., *Treatment with 5-HT potentiates development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 2): p. H1173-81.
278. Staub, N.C., *Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction*. Chest, 1985. **88**(4 Suppl): p. 240S-245S.
279. Callebert, J., et al., *Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine(2B) receptors in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(2): p. 724-31.
280. Ishii, T., et al., *Association of serotonin transporter gene variation with smoking, chronic obstructive pulmonary disease, and its depressive symptoms*. J Hum Genet, 2010. **56**(1): p. 41-6.
281. Guignabert, C., et al., *Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2812-9.
282. Eddahibi, S., et al., *Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia*. Circulation, 2006. **113**(15): p. 1857-64.
283. Kim, K.M., et al., *Regulation of apoptosis by nitrosative stress*. J Biochem Mol Biol, 2002. **35**(1): p. 127-33.
284. Gothert, M., et al., *Genetic variation in human 5-HT receptors: potential pathogenetic and pharmacological role*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **861**: p. 26-30.

-
285. Ullmer, C., et al., *Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels*. FEBS Lett, 1995. **370**(3): p. 215-21.
286. Majo, J., H. Ghezzi, and M.G. Cosio, *Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema*. Eur Respir J, 2001. **17**(5): p. 946-53.
287. Kasahara, Y., et al., *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema*. J Clin Invest, 2000. **106**(11): p. 1311-9.
288. Dony, E., *Therapeutischer Effekt des Protein-Tyrosinkinasehemmers Imatinib (STI 571) im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte.*, in *JLU Giessen*. 2006: Giessen.
289. Stenmark, K.R. and R.P. Mecham, *Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 89-144.
290. Rabinovitch, M., *Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix*. Clin Chest Med, 2001. **22**(3): p. 433-49, viii.
291. Dougall, I.G., et al., *Dual dopamine D2 receptor and beta2-adrenoceptor agonists for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: the pre-clinical rationale*. Respir Med, 2003. **97 Suppl A**: p. S3-7.
292. Birrell, M.A., et al., *Effect of dopamine receptor agonists on sensory nerve activity: possible therapeutic targets for the treatment of asthma and COPD*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(4): p. 620-8.
293. Mizuta, K., et al., *The dopamine D(2) receptor is expressed and sensitizes adenylyl cyclase activity in airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **302**(3): p. L316-24.
294. Barnes, P.J., *Neurogenic inflammation in the airways*. Respir Physiol, 2001. **125**(1-2): p. 145-54.
295. Peiser, C., et al., *Dopamine D2 receptor mRNA expression is increased in the jugular-nodose ganglia of rats with nitrogen dioxide-induced chronic bronchitis*. Neurosci Lett, 2009. **465**(2): p. 143-6.
296. Peiser, C., et al., *Dopamine type 2 receptor expression and function in rodent sensory neurons projecting to the airways*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(1): p. L153-8.
297. Docherty, J.R., *Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors*. Eur J Pharmacol, 1998. **361**(1): p. 1-15.

- 298. Guimaraes, S. and D. Moura, *Vascular adrenoceptors: an update*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 319-56.
- 299. Brown, W.M., *Treating COPD with PDE 4 inhibitors*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2007. **2**(4): p. 517-33.
- 300. Wittmann, M. and P.S. Helliwell, *Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases*. Dermatol Ther (Heidelb), 2013. **3**(1): p. 1-15.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Lunge und des Austauschs von Sauerstoff (O ₂) und Kohlendioxid (CO ₂) in den Alveolen (modifiziert nach krebshilfe.net [7] und www.jameda.de [8])	19
Abbildung 2.2: Lungen- und Körperkreislauf des Blutes.....	20
Abbildung 2.3: Aufbau von Gefäßen und Alveolen.....	21
Abbildung 2.4: Messung der Atemvolumina mit einem Spirometer.....	23
Abbildung 2.5: Mechanismen der Limitation des Atemflusses in COPD.....	25
Abbildung 2.6: Risikofaktoren der COPD.....	27
Abbildung 2.7: Pathophysiologie der COPD (modifiziert nach Vogelmeier [52])	30
Abbildung 2.8: An der COPD-Entzündung beteiligte Zellen und pathologische Effekte (modifiziert nach Barnes und Vogelmeier [16, 52])	33
Abbildung 2.9: Protease-Antiprotease-Dysbalance und die Bedeutung in der COPD-Pathogenese.....	35
Abbildung 2.10: Reaktive Sauerstoffmetabolite und ihre zerstörenden Effekte in COPD.....	37
Abbildung 2.11: Interaktion der Apoptose mit pathogenetischen Mechanismen der COPD (verändert nach Demedts [91]).....	38
Abbildung 2.12: Synthese von Serotonin.....	42
Abbildung 2.13: Biochemie des Serotonins (5-HT) am Beispiel des synaptischen Spalts zwischen zwei Neuronen.....	43
Abbildung 2.14: Einfluß von Serotonin außerhalb des Zentralen Nervensystems	44
Abbildung 2.15: Strukturformel von Tergurid	50
Abbildung 3.1.: C57BL/6J (Quelle: criver.com) [218]	64
Abbildung 3.2 a-c: Aufbau der Rauchmaschine in Darstellung der einzelnen Einheiten.	65
Abbildung 3.3: Behandlungsgruppen des 8 monatigen Terguridversuchs.	66
Abbildung 3.4a-f: alveoläre Morphometrie.....	75
Abbildung 3.5a-f: Bestimmung des Muskularisierungsgrades.....	78
Abbildung 4.1: mRNA-Expression von 5-HTR _{2A} , 5-HTR _{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von gesunden Donoren und COPD-Patienten.....	92
Abbildung 4.2: Protein-Expression von 5-HTR _{2A} , 5-HTR _{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von gesunden Donoren und COPD-Patienten.....	93
Abbildung 4.3: mRNA-Expression von 5-HTR _{2A} , 5-HTR _{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von Kontrollen und 3- bzw. 8-monatigen Rauch-exponierten Wt-Mäusen.....	95

Abbildung 4.4: Protein-Expression von 5-HTR _{2A} , 5-HTR _{2B} und 5-HTT in Lungenhomogenat von Kontrollen und 3- bzw. 8-monatigen Rauch-exponierten Wt-Mäusen.....	96
Abbildung 4.5: Darstellung der Überlebensrate der Mäuse während der präventiven Behandlung mit Tergurid	98
Abbildung 4.6: Darstellung der Veränderung des Körpergewichts der Mäuse während der präventiven Behandlung mit Tergurid	99
Abbildung 4.7: Darstellung des arteriellen Sauerstoff-Partialdruckes und des Hämatokritwertes nach präventiver Terguridbehandlung und 8-monatiger Rauch-Exposition	100
Abbildung 4.8: Darstellung des präventiven Einflusses von Tergurid auf die Lungenfunktion der Tiere nach 8-monatiger Rauch-Exposition	102
Abbildung 4.9: Darstellung der präventiven Tergurid-Behandlung auf die Emphysementwicklung nach 8-monatiger Rauch-Exposition	103
Abbildung 4.10: Repräsentative histologische Bilder zur Alveolarstruktur von Tergurid-behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition im Vergleich zu den Kontrollgruppen	104
Abbildung 4.11: Darstellung des Effekts von Tergurid auf die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie der Mäuse nach 8-monatiger Rauchexposition.	107
Abbildung 4.12: Veränderungen des Gewichts des rechten und linken Ventrikels plus Septum und deren Verhältnis unter präventiver Tergurid-Behandlung nach 8-monatiger Rauch-Exposition	108
Abbildung 4.13: Darstellung des präventiven Effektes von Tergurid auf den prozentualen Anteil nicht-, partiell- und voll-muskularisierter Lungengefäße nach 8-monatiger Rauch-Exposition	110
Abbildung 4.14: Repräsentative histologische Bilder zur Visualisierung der Muskularisierung pulmonaler Arterien in Tergurid-behandelten Mäusen nach 8-monatiger Rauchexposition	111
Abbildung 4.15: Darstellung des Verhältnisses der Alveolen zu Gefäßen unter Tergurid nach 8-monatiger Rauchexposition.....	112
Abbildung 4.16: Serotonin-Konzentration im Plasma der Tergurid-behandelten Mäuse nach 8-monatiger Rauch-Exposition	114
Abbildung 4.17: mRNA-Expression von 5-HTR _{2A} , 5-HTR _{2B} und 5-HTT in mikrodissertieren Gefäßen und Alveolar-Septen nach präventiver Tergurid-Behandlung und 8-monatiger Rauch-Exposition.....	116
Abbildung 4.18: Darstellung der 3-Nitrotyrosin-Bildung in Tergurid-behandelten und 8-monatigen Rauch-exponierten Mauslungen	118

Abbildung 4.19: Effekt von Serotonin und/oder Tergurid auf die Apoptose-Rate muriner Endothel- und Epithelzellen	119
Abbildung 4.20 Effekt von Serotonin und/oder Tergurid auf die Proliferation muriner Endothel- und Epithelzellen	120

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Klassifizierung der Schweregrade der COPD nach GOLD	26
Tabelle 2.2: 5-HT-Rezeptor-Familien.....	45
Tabelle 3.1: Geräte/Materialien/Software für Rauchexposition der Mäuse.....	53
Tabelle 3.2: Injektionslösungen und Substanzen für physiologische Untersuchungen	53
Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien für physiologische Untersuchungen.....	54
Tabelle 3.4: Geräte/Materialien/Software für Gavage, Lungenfunktions- und Hämodynamik-Messungen	55
Tabelle 3.5: Geräte/Software/Makros für histologische Untersuchungen	56
Tabelle 3.6: Verbrauchsmaterialien für histologische Untersuchungen	56
Tabelle 3.7: Lösungen, Kits und Antikörper für histologische Färbungen	57
Tabelle 3.8: Verwendete Geräte für Zellkulturuntersuchungen.....	58
Tabelle 3.9: Verbrauchsmaterialien für Zellkulturuntersuchungen	58
Tabelle 3.10: Lösungen, Kits, Assays und Antikörper für Zellkulturuntersuchungen	59
Tabelle 3.11: Geräte für molekularbiologische Untersuchungen.....	60
Tabelle 3.12: Verbrauchsmaterialien/Lösungen/Chemikalien für molekularbiologische Untersuchungen.....	60
Tabelle 3.13: Kits und Standards für molekularbiologische Untersuchungen.....	62
Tabelle 3.14: Auflistung der verwendeten Primer-Paare	63
Tabelle 3.15: Verwendete Antikörper für Western Blot-Analysen.....	63
Tabelle 3.16: Patienten-Charakteristika	67
Tabelle 3.17: Färbeprotokoll für die HE-Färbung am Mauslungengewebe.....	74
Tabelle 3.18: Färbeprotokoll für die Doppelfärbung mit Peroxidase am Mauslungengewebe.....	76
Tabelle 3.19: Färbeprotokoll für die 3-Nitrotyrosin-Färbung mit Trypsin am Mauslungengewebe.....	80
Tabelle 3.20: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion	86
Tabelle 3.21: Temperaturprofil der Real-Time PCR.	86
Tabelle 3.22: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE	89

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, September 2013

Alexandra Pichl

12 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Dissertation unterstützt haben und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

- ❖ Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Clauss danke ich besonders für die Betreuung im Fachbereich Biologie.
- ❖ Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.
- ❖ Weiterhin möchte ich den beiden Prüfern Prof. Dr. med. Hossein Ardeschir Ghofrani und Prof. Dr. rer. nat. Adriaan Dorrsteijn ganz herzlich danken.
- ❖ Danken möchte ich auch Herrn Rudolf Reiter für die wertvolle Diskussion über die Wirkung von Tergurid.
- ❖ Einen besonderen herzlichen Dank möchte ich dem „COPD-Team“: Nirmal Parajuli, Michael Seimetz, Athanasios Fysikopoulos und Mariola Bednorz für die fortwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft aussprechen.
- ❖ Bei Herrn Dr. Jochen Wilhelm möchte ich mich für Hilfe bei den statistischen Auswertungen bedanken.
- ❖ Danken möchte ich auch Karin Quanz, Ingrid Breitenborn-Müller, Lisa Fröhlich, Carmen Homberger, Elisabeth Kappes, Miriam Wessendorf, Martin Stellwagen, Aydin Keskin, Christina Vroom und Ewa Bienek für die technische Unterstützung und freundliche Atmosphäre.

- ❖ Einen besonderen Dank möchte ich allen meinen ECCPS-Mitarbeitern aussprechen. Vor allem möchte ich mich bei Daniela Haag, Simone Kraut, Friederike Weisel, Benno Crzesik, Florian Veit und Oleg Pak für das gute und humorvolle Arbeitsklima bedanken.
- ❖ Ebenfalls möchte ich mich besonders bei Peter Rauschkolb, Katrin Milger und Florian Veit bedanken, die mich durch ihre konstruktive Kritik und ihre Hilfsbereitschaft bei der Korrektur meiner Arbeit unterstützt haben.
- ❖ Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Werner Seeger und Dr. Rory E. Morty für die Aufnahme in das Graduiertenprogramm „Molecular Biology and Medicine of the Lung“ (MBML) bedanken.
- ❖ Bedanken möchte ich mich auch bei allen Menschen und Tieren, die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht miterleben konnten. In meinem Herzen werdet ihr weiterleben.
- ❖ Der größte Dank, für den es keine Worte gibt, gilt jedoch Peter Rauschkolb, sowie meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden, die mir bedingungslosen Halt, Vertrauen, Motivation, moralische Unterstützung, Geduld und Liebe geschenkt haben, wodurch ich die Kraft bekommen habe, alles für mich zunächst Unmögliche zum Möglichen zu machen.

13 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

14 Wissenschaftliche Beiträge

14.1 Veröffentlichungen

Juliana Heidler, Athanasios Fysikopoulos, Frank Wempe, Michael Seimetz, Thorsten Bangsow, Ana Tomasovic, Florian Veit, Susan Scheibe, **Alexandra Pichl**, Friederike Weisel, K C Kent Lloyd, Peter Jaksch, Walter Klepetko, Norbert Weissmann, and Harald von Melchner. *Sestrin-2, a repressor of PDGFR β signalling, promotes cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice and is upregulated in patients with COPD*. Dis. Model. Mech. 2013 dmm.013482; First posted online August 29, 2013, doi:10.1242/dmm.013482

A Pichl, N Parajuli, M Seimetz, JP Stasch, R Frey, RT Schermuly, W Seeger, F Grimminger, HA Ghofrani, N Weissmann. *Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase by Riociguat prevents Tobacco smoke-induced Pulmonary Hypertension in mice*. Pneumologie 2012; 66 - A310
DOI: 10.1055/s-0032-1315498 (Abstract)

Seimetz M, Parajuli N, **Pichl A**, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, Milger K, Egemnazarov B, Turowska A, Fuchs B, Nikam S, Roth M, Sydykov A, Medebach T, Klepetko W, Jaksch P, Dumitrascu R, Garn H, Voswinckel R, Kostin S, Seeger W, Schermuly RT, Grimminger F, and Ghofrani HA, Weissmann N. *Inducible NOS inhibition cures tobacco smoke induced emphysema and pulmonary hypertension in mice*. Cell. 2011 Oct 14; 147 (2):293-305.

Althaus M, **Pichl A**, Clauss WG, Seeger W, Fronius M, Morty RE. *Nitric oxide inhibits highly selective sodium channels and the Na⁺/K⁺-ATPase in H441 cells*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 Jan; 44 (1):53-65.

In Revision:

Weisel FC, Kloepping C, **Pichl A**, Sydykov A, Kojonazarov B, Wilhelm J, Roth M, Ridge KM, Igarashi K, Nishimura K, Maison W, Wackendorff, Klepetko W, Schermuly RT, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W, Weissmann N and Kwapiszewska G. *Impact of s-adenosylmethionine decarboxylase 1 in pulmonary vascular remodeling*.

14.2 Kongressbeiträge

14.2.1 Vorträge

Pichl A (2011) „*The effect of Terguride on tobacco smoke-induced emphysema in mice*“, MBML Retreat, Rauischholzhausen, Deutschland.

Pichl A (2010) „*Smoke-induced emphysema-is there pulmonary hypertension?*“, MBML Retreat, Rauischholzhausen, Deutschland.

14.2.2 Poster/Posterdiskussion

Pichl A, Seimetz M, Parajuli N, Stasch J.P, Frey R, Schermuly R.T, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani H.A, and Weissmann N. *The soluble guanylatecyclase stimulator riociguat prevents from tobacco smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema.* Pulmonary Vascular Research Institute (PVRI), Annual Congress, January 2013, Istanbul.

Alexandra Pichl, Nirmal Parajuli, Michael Seimetz, Johannes-Peter Stasch, Reiner Frey, Ralph T. Schermuly, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, Hossein A. Ghofrani, and Norbert Weissmann. *Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase by Riociguat prevents Tobacco smoke-induced Pulmonary Hypertension in mice.* UGMLC/DZL Symposium – Remodelling, Repair and Regeneration in Lung Disease, Marburg 2012.

Alexandra Pichl, Nirmal Parajuli, Michael Seimetz, Athanasios Fysikopoulos, Daniela Haag, Rudolf Reiter, Jan Grimminger, Werner Seeger, Ralph T. Schermuly, Friedrich Grimminger, Hossein A. Ghofrani, and Norbert Weissmann. *A possible role of serotonin for the development of tobacco-smoke induced lung emphysema and pulmonary hypertension.* Am J RespirCrit Care Med 185; 2012:A2275. American Thoracic Society (ATS); Annual Congress; San Francisco; Mai 2012.

Seimetz,M., Parajuli,N., **Pichl,A.**, Stasch,J.P., Frey,R., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *Prevention of Cigarette Smoke-induced Pulmonary Hypertension by the Soluble GuanylateCyclase Stimulator Riociguat*. Am J RespirCrit Care Med 185;2012:A3416. American Thoracic Society (ATS), Annual Congress; San Francisco; May 2012.

Seimetz,M., Parajuli,N., **Pichl,A.**, Stasch,J.P., Frey,R., Schermuly,R.T., Ghofrani,H.A., Seeger,W., Grimminger,F., and Weissmann,N. *Effects of the Soluble GuanylateCyclase Stimulator Riociguat on Emphysema Development in Tobacco-Smoke Exposed Mice*. Am J RespirCrit Care Med 183;2011:A3107. American Thoracic Society (ATS), Annual Congress, Mai 2011.

14.3 Preise

Poster Award→ Symposium „Remodeling, Repair and Regeneration on Lung Disease”; UGMLC/DZL 2012, Marburg

Travel Award → American Thoracic Society, San Francisco, California, 2012